

**Entwicklung einer multivalenten Reportersonde zur
Visualisierung endogener Aktivität der kleinen GTPase Rap
in lebenden Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller Universität Jena**

von

Dipl.-Biochemiker Rico Pusch

geboren am 6. März in Wolfen

Gutachter:

Prof. Dr. Reinhard Wetzker

AG Molekulare Zellbiologie
Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Drackendorfer Str. 1
07747 Jena

Prof. Dr. Claus Liebmann

AG Biochemische Pharmakologie
Biochemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Philosophenweg 12
07743 Jena

Prof. Dr. Christian Herrmann

AG Proteininteraktionen
Physikalische Chemie I
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstrasse 150
44780 Bochum

Tag des Rigorosums: 23. Mai 2005 Note:

Tag der Verteidigung: 8. April 2005 Note:

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Signaltransduktion	2
2.2 Kleine GTP-bindende Proteine	3
2.2.1 Struktur und posttranslationelle Modifizierung	4
2.2.2 Ras-Superfamilie	5
2.3 Rap	6
2.3.1 Guaninnukleotidaustauschfaktoren	6
2.3.2 GTPase-aktivierende Proteine	8
2.3.3 Rap als Regulator der MAP-Kinase Erk	9
2.3.4 Rap in T-Zellen: Anergie und Inside-out-Signaltransduktion von Integrinen	11
2.3.5 Rap in B-Zellen	14
2.3.6 Rap und E-Cadherine	15
2.4 Visualisierung von Signaltransduktionsprozessen	16
2.4.1 Visualisierung der Aktivität von Ras-GTPasen	17
2.4.2 Visualisierung der Lokalisation und Aktivität von Rap	21
3. Zielstellung	24
4. Material und Methoden	25
4.1 Materialien	25
4.1.1 Eukaryontische Zelllinien	25
4.1.2 Bakterienstämme	25
4.1.3 Antikörper	25
4.1.4 Plasmide	25
4.1.5 Oligonukleotide	27
4.1.6 Weitere Materialien	28
4.1.7 Puffer und Lösungen	29
4.2 Methoden	31
4.2.1 Arbeiten mit DNA	31
4.2.2 Proteinaufreinigung	33
4.2.3 GAP-Assay	35
4.2.4 Zellkultur	36
4.2.5 GST-RGR Pull Down	37
4.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	37
4.2.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	38

5. Ergebnisse	40
5.1 Veränderte Bindungseigenschaften durch RGR – Mutation	40
5.1.1 Klonierung	40
5.1.2 Aufreinigung	41
5.1.3 Effekt der Mutationen auf die Rap-Bindung – GAP-Assay	41
5.2 Veränderte Bindungseigenschaften durch RGR-Oligomerisierung	45
5.2.1 Klonierung	45
5.2.2 Effekt der Oligomerisierung auf die Rap-Bindung – GAP-Assay	45
5.3 Klonierung fluoreszenzmarkierter RGRs und Rap-Varianten	47
5.3.1 GFP-markierte RGR-Oligomere	47
5.3.2 DsRed1-markierte Rap-Isoformen und deren Mutanten	47
5.4 Subzelluläre Lokalisation von Rap1	48
5.5 Verwendbarkeit der RGR-Trimere als Rap-GTP-Sonden	52
5.5.1 RGR-Oligomerisierung verbessert die Translokalisierung zu aktivem Rap1	52
5.5.2 Kolokalisation von RGR-WT-3 und aktivem Rap1 ist bindungsbasiert	54
5.5.3 RGR-WT-3 kolokalisiert mit aktivem Rap2	55
5.5.4 RGR-WT-3 kolokalisiert mit aktivem Ras	56
5.5.5 RGR-K48D-3 ist spezifisch für Rap	58
5.5.6 RGR-WT-3, aber nicht RGR-K48D3, inhibiert die Ras-Signaltransduktion	63
5.5.7 Inhibierung der Rap-GAP–Aktivität durch RGRs	63
5.6 Visualisierung extrazellulär stimulierter Rap-Aktivierung	66
5.6.1 Endogene Rap-Aktivierung in TPA stimulierten Cos-7 Zellen	66
5.6.2 Inhibierung der Rap-Aktivierung verhindert RGR-K48D-3 – Akkumulation	68
5.6.3 Rap-Aktivierung ist verbunden mit Translokalisierung von Rap zur Plasmamembran	70
6. Diskussion	72
6.1 Veränderte Bindungseigenschaften durch RGR-Mutation	72
6.2 Veränderte Bindungseigenschaften durch RGR-Oligomerisierung	74
6.3 Subzelluläre Lokalisation von Rap1	75
6.4 RGR-WT-3 als Rap-GTP – Reportersonde	76
6.5 RGR-K48D-3 als Rap-GTP – Reportersonde	78
6.6 TPA-induzierte endogene Rap Aktivierung	80
6.7 RGR-K48D-3 Akkumulation korreliert mit Rap-Aktivierung	83
6.8 Vorteile von RGR-K48D-3 gegenüber anderen Rap-GTP-Reportern	83
6.9 Induzierbare Translokalisierung von Rap zur Plasmamembran	84
6.10 Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten für RGR-K48D-3	85

7. Referenzen	86
8. Abkürzungsverzeichnis	93

Anlagen

Selbstständigkeitserklärung	I
Danksagungen	II
Lebenslauf	III
Publikationen und wissenschaftliche Vorträge	IV

1. Zusammenfassung

Viele molekularbiologischen Methoden zur Analyse von Signaltransduktionsprozessen sind darauf ausgerichtet, zu zeigen *Welche* Signaltransduktionsereignisse in Zellen stattfinden können. Für die korrekte Weiterleitung von Signalen ist aber auch die Frage *Wo?* und *Wann?* einzelne Ereignisse auftreten entscheidend. Daher gewinnt die räumlich-zeitliche Auflösung zellulärer Prozesse mittels fluoreszenzmarkierter Proteine zunehmend an Bedeutung.

Die meisten dieser Methoden erfordern allerdings die nachteilige Überexpression des untersuchten Zielproteins. In dieser Arbeit wurde ausgehend von der RalGDS-Rap-Bindedomäne (RGR) eine fluoreszente, multivalente Rap-GTP – Reportersonde entwickelt. Diese kann auf Überexpression verzichten und macht durch spezifische Rekrutierung zu Rap-GTP die endogene Rap-Aktivierung in lebenden Zellen sichtbar. Rap ist eine kleine GTPase der Ras-Subfamilie, die unter anderem an der Regulation zellulärer Prozesse wie Adhäsion, Migration, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist. In Cos-7 Zellen befindet sich Rap1 hauptsächlich in endosomalen Vesikeln und in perinukleären Strukturen, die teilweise mit Golgi-Markern und Endosomen-Markern überlappen. GFP-markierte wildtypische RGR-WT-1 wird in Cos-7 Zellen nur ineffizient zu überexprimiertem aktivem Rap rekrutiert. Dies konnte durch RGR-Oligomerisierung erheblich verbessert werden, dabei wurden zwei oder drei RGRs miteinander über kurze Linker verbunden. Trimere RGR-WT-3 ist aber für den Einsatz als Reportersonde nicht geeignet. Einerseits bindet RGR-WT-3 Rap-GTP so stark, dass die Rap-GAP – vermittelte Rap-Inaktivierung verhindert wird und so eine unphysiologische Rap-Aktivierung angezeigt wird. Andererseits ist auch die Spezifität der Bindung eingeschränkt. RGR-WT-3 kolokalisiert deutlich mit konstitutiv aktivem Ras. Eine Optimierung der Bindungseigenschaften der Reportersonde gelang durch RGR-Mutation. Nach Analyse mehrerer RGR-Mutanten wurde mit RGR-K48D-3 eine Reportersonde erhalten, die sowohl die verbesserte Rekrutierung einer multivalenten Sonde als auch Spezifität für Rap aufweist und gleichzeitig die negative Regulation von Rap durch Rap-GAPs zulässt. RGR-K48D-3 kann die Aktivierung von endogenem Rap visualisieren. Beispielhaft wurde diese in TPA-stimulierten Cos-7 Zellen verfolgt. Dabei wurde aktives Rap an *Membrane Ruffles*, an der Front sich ausbreitender Lamellipodien und bei der Abschnürung von Makropinosomen nachgewiesen. Dass die beobachtete RGR-K48D-3 Akkumulation tatsächlich auf der Aktivierung von Rap beruht, wurde dadurch bestätigt, dass eine PDGF-Rezeptor-Mutante, die Rap nicht aktiviert, im Gegensatz zu wildtypischem PDGF-Rezeptor auch nicht die Translokation von RGR-K48D-3 an die Plasmamembran induziert. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Rap häufig mit dessen Translokation zur Plasmamembran einhergeht. Dies konnte auch für die hier betrachtete TPA-induzierte Rap-Aktivierung gezeigt werden. Dabei wurde erstmalig innerhalb einer lebenden Zelle die Translokation von Rap zur Plasmamembran zusammen mit der damit verbundenen Rap-Aktivierung visualisiert. Mit RGR-K48D-3 steht eine leistungsfähige Reportersonde zur räumlich-zeitlichen Auflösung endogener Rap-Aktivität zur Verfügung. Das generelle Prinzip der Oligomerisierung entsprechender Protein-Protein-Bindedomänen kann auch zur Entwicklung effizienter Reportersonde für weitere GTPasen und andere Proteine genutzt werden.

2. Einleitung

2.1 Signaltransduktion

12 % der humanen Gene codieren für Proteine, die an der Weiterleitung und Verarbeitung von Signalen beteiligt sind (Venter, 2001). Diese Mannigfaltigkeit erlaubt es der humanen Zelle unterschiedliche sowohl extra- als auch intrazelluläre Informationen zu erfassen, zu integrieren und darauf mit zellulären Prozessen wie zum Beispiel Proliferation, Differenzierung oder aber auch Apoptose zu reagieren.

Für die Weiterleitung extrazellulärer Signale sind verschiedene gut untersuchte Signalkaskaden etabliert. Die Verwendung mehrerer hintereinander geschalteter Proteine, ermöglicht, den „Transport“ des Signals zum Beispiel von der Plasmamembran in den Zellkern, die Amplifizierung des Signals und vor allem die Vernetzung von Signalkaskaden auf unterschiedlichen Ebenen. Somit verfügt die Zelle über ein scheinbar unendliches komplexes Netzwerk an Signalproteinen, die sich auf vielfältigen Wegen gegenseitig beeinflussen können. Dabei verwendet die Zelle aber einen relativ überschaubaren Satz an generellen Prinzipien zur Signalweiterleitung.

Die subzelluläre Lokalisation von Signalproteinen ist für deren Funktion entscheidend. So wird zum Beispiel der Transkriptionsfaktor NFκB in Abwesenheit von aktivierenden Signalen durch Bindung an IκB an der Translokation in den Zellkern gehindert. Eine besondere Bedeutung bei der Regulation der subzellulären Lokalisation kommt den so genannten Adapterproteinen zu, die über eine oder mehrere Protein-Protein-Interaktions-Domänen verfügen und essentiell für die Assemblierung von Signaltransduktionskomplexen sind. Dazu zählen beispielsweise Shc und Grb2, die an der Aktivierung von Ras beteiligt sind.

Ein anderes Prinzip zur Signalweiterleitung stellt die Regulation der Konzentration an kleinen schnell diffundierenden Signalmolekülen, so genannter *Second Messenger*, dar. Phospholipase C (PLC) hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Dadurch entstehen die beiden *Second Messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Letzteres kann daraufhin Ca²⁺, einen weiteren *Second Messenger*, aus intrazellulären Speichern freisetzen. Die Regulation der lokalen Konzentration von Ionen, in diesem Fall hauptsächlich von Na⁺ und K⁺, dient auch zur Weiterleitung von Aktionspotentialen in neuronalen Zellen.

Des Weiteren kann die Zelle durch reversible Modifizierung von Proteinen molekulare Schalter erzeugen. Eine häufig auftretende Modifizierung ist die Phosphorylierung von Proteinen an Serin, Threonin oder Tyrosin. Diese Phosphorylierungen können entweder die enzymatische Aktivität von Proteinen oder deren Bindungseigenschaften ändern. Etliche Signalproteine besitzen Domänen die selektiv an phosphorylierte Aminosäuren binden können. Tyrosinphosphorylierungen werden von SH2- und PTB-Domänen erkannt, Serin-

Phosphorylierung dagegen durch 14-3-3 Domänen. Neben der kovalenten Modifizierung kann auch die Bindung von kleinen Molekülen zwischen dem inaktiven und dem aktiven Zustand von Signalproteinen entscheiden. So wird etwa die Proteinkinase A (PKA) durch Bindung von cAMP aktiviert. Die Assoziation mit Guaninnukleotiden wird von einer großen Gruppe von Signalmolekülen als molekulare Grundlage für die Ausbildung einer Schalterfunktion genutzt. In GDP-gebundener Form sind diese inaktiv. In GTP-gebundener Form dagegen können sie Signale weiterleiten. Die GTP-bindenden Proteine werden in die heterotrimeren G-Proteine, die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden, und in die kleinen GTP-bindenden Proteine mit einer molaren Masse von 20-40 kDa unterteilt.

2.2 Kleine GTP-bindenden Proteine

Kleine GTP-bindende Proteine (auch: kleine GTPasen) dienen als molekulare Schalter in der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse, wie der Translation, der extrazellulär-induzierten Signaltransduktion und dem endosomalen und nukleären Transportes. Dabei durchlaufen sie einen Zyklus wechselnder Aktivierung und Inaktivierung. Der aktive Zustand ist durch die Bindung von GTP und der inaktive Zustand durch Bindung von GDP gekennzeichnet. Der Übergang zwischen beiden Konformationen wird durch zwei Proteinklassen reguliert. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) induzieren die Dissoziation von GDP. Die dabei intermediär entstehende nukleotidfreie GTPase bindet daraufhin ein neues Nukleotid. Aufgrund des intrazellulären GTP-Überschusses ist dies fast immer GTP. Die GTPase wird also aktiviert. Nachgeschaltete Proteine (Effektoren), die selektiv die aktive GTP-gebundene Form erkennen, können nun aktiviert werden und so die Signale weiterleiten. Die Inaktivierung der GTPase erfordert die GTP-Hydrolyse. Dieser Schritt ist irreversibel, sorgt also dafür, dass der Zyklus nur in eine Richtung durchlaufen wird. Da die intrinsische GTPase-Aktivität gering ist, kommt es nur bei Bindung GTPase-aktivierender Proteine (GAPs) zu einer effizienten Inaktivierung. Die Aktivierung und Lokalisation einiger GTPasen (Rho, Rab und Ran) wird noch durch eine weitere Gruppe regulatorischer Proteine kontrolliert. Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) verhindern sowohl die basale als auch die GEF induzierte GDP-Dissoziation und halten zudem die GDP-Form im Cytoplasma.

2.2.1 Struktur und posttranslationelle Modifikation

Die GTP-bindenden Proteine der Ras-Superfamilie sind in ihrer Primärstruktur zwar nur zu 30-55 % identisch. Kristallographie und NMR Daten aber zeigen eine gemeinsame Topologie der GTP-bindenden Domänen. Am Beispiel von Ha-Ras wurde gezeigt, dass sich die GDP- und die GTP-gebundene Konformationen in zwei Regionen unterscheiden (*Switch I* und *II*). Die *Switch I* – Region umfasst die Schleife L2 und den β -Strang $\beta 2$ und ist Teil der Effektor-Bindestelle. Die *Switch II* – Region liegt innerhalb der Schleife L4 und der α -Helix $\alpha 2$ (Bos, 2001).

Viele der Mitglieder der Ras-Superfamilie werden posttranslational modifiziert. Dies ist entscheidend für ihre korrekte Membranlokalisation und damit für ihre Funktion. Nur Arf wird N-terminal durch Myristylierung eines Glycinrestes modifiziert. Alle anderen Ras-GTPasen erfahren eine C-terminale Modifizierung, von der fünf verschiedene Typen bekannt sind. Allen gemeinsam ist eine Isoprenylierung an Cysteinresten verbunden mit einer C-terminalen Carboxymethylierung. Als Beispiel seien hier die für Ha-Ras und Rap1 typischen Modifikationen beschrieben. Neu synthetisiertes Ras besitzt die C-terminale Sequenz CaaX (a – aliphatisch, X – beliebig). Erster Schritt der Prozessierung ist die Farnesylierung des Cysteins durch die cytosolische Farnesyltransferase. Der Farnesylrest gestattet die Verankerung in der cytosolischen Seite der Membran des Endoplasmatischen Reticulums. Dort kommt es zur proteolytischen Abspaltung der drei C-terminalen Aminosäuren aaX, gefolgt von der Carboxymethylierung des neu entstandenen C-Terminus. Zusätzlich wird Ha-Ras an zwei weiteren C-terminal gelegenen Cysteinresten palmitoyliert. Der Reifungsprozess endet mit dem Transport in den Golgi, von wo aus Ras gebundenen an exocytotische Vesikel zur Plasmamembran transloziert wird. Rap1 unterscheidet sich von Ras dadurch, dass es an Stelle des Farnesylrestes einen Geranylgeranylrest trägt und die Membranbindung nicht durch eine weitere Lipidmodifizierung sondern durch eine polybasische Region am C-Terminus unterstützt wird. Diese unterschiedlichen C-terminalen Modifizierungen werden dafür verantwortlich gemacht, dass Ras hauptsächlich an der Plasmamembran, Rap dagegen vor allem an intrazellulären Membranen gefunden wird (Takai, 2001).

2.2.2 Ras-Superfamilie

Die Ras-Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine umfasst mehr als 100 Mitglieder (in Hefe und Mammalia). Diese werden in fünf Subfamilien funktionell und strukturell verwandter Proteine unterteilt. Jede dieser Subfamilie ist charakteristischerweise an der Regulation bestimmter zellulärer Prozesse beteiligt.

Die Rab-Subfamilie umfasst die meisten Mitglieder. Rab-Proteine sind in nahezu allen Varianten des vesikulären Transportes involviert. Den einzelnen Isoformen kommen dabei jeweils spezielle Aufgaben zu, so ist zum Beispiel Rab5 an der Bildung endocytotischer Vesikel beteiligt, Rab6 indessen reguliert den Transport zwischen den Golgi-Zisternen.

Auch die Mitglieder der Arf-Subfamilie sind Regulatoren des vesikulären Transportes. Die Mantel-Proteine COPI und COPII werden von Arf-Proteinen rekrutiert, dies ist essentiell für die Initiation der Vesikelbildung. Die Bildung von endocytotischen Clathrin-ummantelten Vesikeln an der Plasmamembran ist Arf-unabhängig.

Die Ran-Subfamilie umfasst neben zwei Hefe-GTPase nur ein humanes Protein. Ran ist ein wichtiger Regulator des Transportes durch die Kernmembran. Während der M-Phase ist Ran auch an der Organisation der Mikrotubuli beteiligt.

Gut untersuchte Mitglieder der Rho-Subfamilie sind neben den verschiedenen Rho-Isoformen Rac und Cdc42. Alle drei sind an der Reorganisation des Aktinskeletts beteiligt, induzieren aber unterschiedliche cytoskelettale Strukturen. Charakteristisch für Rho ist die Ausbildung von Stressfasern. Rac-Aktivierung resultiert in Ruffling und in der Ausbildung von Lamellipodien. Cdc42 dagegen induziert Filopodien. Rho, Rac und Cdc42 können zusätzlich auch Einfluss auf die Genexpression nehmen.

Derzeit sind 19 Mitglieder der Ras-Subfamilie bekannt, darunter Ha-, Ki-, N-, M- Ras, TC21, Ral sowie 4 Rap-Isoformen. Sie vermitteln ihre Effekte hauptsächlich durch Induktion der Genexpression und regulieren so zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Takai, 2001). Einer der ersten etablierten Signalwege und Prototyp für die Weiterleitung extrazellulärer, mitogener Signale hin zur Aktivierung der Genexpression ist der Ras / MAPK –Weg. Mitogene Stimuli wie EGF (*epidermal growth factor*) aktivieren Rezeptortyrosinkinasen. Dabei werden diese tyrosinphosphoryliert und bilden so Bindestellen für SH2-Domänen-haltige Proteine, wie Grb2. Der Grb2-assoziierte Ras-Austauschfaktor Sos wird so zur Membran transloziert und kann hier Ras-GTP bilden. Dieses bindet c-Raf-1, was eine Kaskade von Proteinphosphorylierungen induziert und in der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der Ets/Elk-Familie resultiert.

2.3 Rap

Humanes Rap1 wurde 1998 aufgrund seiner Homologie zu *Drosophila RAS3* (später umbenannt in *Drosophila RAP1*) kloniert (Pizon, 1988). Kurz darauf wurde gezeigt, dass dieses identisch ist mit Krev-1, welches in der Lage ist, die K-Ras-induzierte Transformation von NIH3T3 Zellen zu unterdrücken (Kitayama, 1989).

Es sind vier Rap-Proteine, bestehend aus zwei Paaren nahezu identischer Isoformen, bekannt. Rap1A und Rap1B sind in ihrer Sequenz zu 95 % und Rap2A und Rap2B zu 90 % identisch. Die Sequenzidentität zwischen Rap1 und Rap2 beträgt nur noch 60 %. Die größten Unterschiede findet man dabei im C-Terminus der Proteine (Caron, 2003).

Rap wird ubiquitär exprimiert. Homologe von Rap findet man auch in niederen Eukaryoten wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Dictyostelium discoideum*. Die Bedeutung von Rap für die eukaryontische Zelle wird dadurch deutlich, dass es weder gelungen ist *Drosophila melanogaster* – Mutanten mit ausgeschaltetem *rap1*-Gen noch Rap1-defiziente Säugerzelllinien zu etablieren (Caron, 2003). Auch gentechnisch veränderte Mäuse, die den Rap-Austauschfaktor C3G nicht exprimieren, sterben bereits während der embryonalen Entwicklung (Ohba, 2001).

Eine Vielzahl von extrazellulären Signalen, die unterschiedlichste Rezeptorklassen stimulieren, führen zur Akkumulation von Rap-GTP. Die Aktivierung von Rap ist demnach ein häufiges und weit verbreitetes Ereignis der intrazellulären Signalverarbeitung. Dies ist möglich, da mehrere unterschiedlich regulierte GEFs und GAPs die Rap-Aktivität an verschiedene Signalwege koppeln (Abb. 2.1). Einige dieser Regulatoren, wie der GEF Epac1 sind spezifisch für Rap, andere, wie beispielsweise CD-GEFIII, zeigen dagegen auch Aktivität gegenüber weiteren Mitgliedern der Ras-Subfamilie.

2.3.1 Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren

Für die Kopplung der Rap-Aktivierung an die Phosphotyrosin-vermittelte Signalweiterleitung ist der Austauschfaktor C3G verantwortlich. Dieser ist konstitutiv mit einem der Adaptorproteinen der Crk-Familie (CrkI, CrkII, CrkL) assoziiert, welches über SH2-Domänen zu tyrosinphosphorylierten Rezeptoren rekrutiert werden kann. Der Crk / C3G – Komplex kann auch durch Phosphorylierung reguliert werden. Phosphorylierung von CrkII nach Insulin-Stimulation, führt zur Dissoziation von C3G und damit zum Ausbleiben der Rap-Aktivierung (Okada, 1998). Murine C3G^{-/-} – Fibroblasten zeigen eine reduzierte Integrin-vermittelte Adhäsion. Ein Hinweis darauf, dass die zentrale Rolle, die Rap in der *inside-out*-Signaltransduktion von Integrinen zukommt (siehe 2.3.4), offenbar auch von der C3G Funktion abhängig ist. C3G kann in geringerem Ausmaß auch R-Ras und TC21 aktivieren (Ohba, 2001).

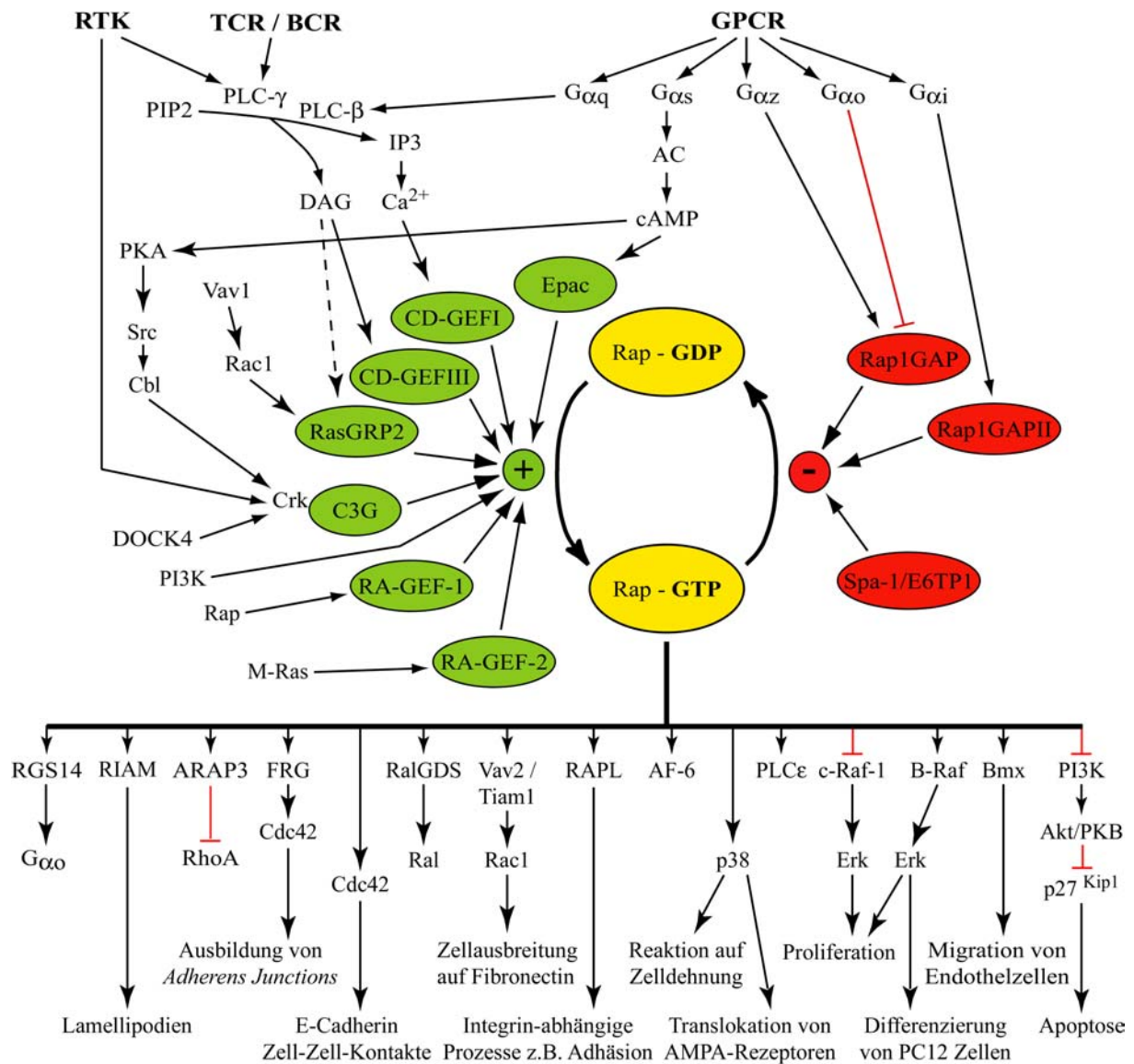


Abb. 2.1 Das Rap – Signaltransduktions – Netzwerk

Der Zyklus zwischen inaktivem Rap-GDP und aktivem Rap-GTP wird durch Rap-GEFs (grün) und Rap-GAPs (rot) reguliert. Diese werden wiederum über vielfältige Signalwege durch verschiedene Rezeptortypen kontrolliert. Rap-GTP reguliert über mehrere Effektoren unterschiedlichste zelluläre Prozesse. Darunter Proliferation, Differenzierung, Apoptose vor allem aber aktin-abhängige Vorgänge, wie Migration, Lamellipodienbildung, Integrin-Adhäsion und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. (Schwarze Pfeile = Aktivierung, Rote Pfeile = Blockierung)

Im Text nicht erwähnte Referenzen: VEGF induzierte Bmx-Rap – Assoziation (Stoletov, 2004); RGS14 als Rap-Effektor (Traver, 2000), ARAP3 ist ein durch PI3K und Rap1 regulierter RhoA-GAP (Krugmann, 2004).

Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels resultiert unter anderem in der Aktivierung von Rap. Typischer Vermittler der cAMP induzierten Signaltransduktion ist die Proteinkinase A (PKA). PKA ist aber nicht in allen Zelltypen für die Aktivierung von Rap nötig. Diese Beobachtung führte zur Identifizierung des Austauschfaktors Epac1, welcher direkt durch die Bindung von cAMP reguliert wird (de Rooij, 1998). Die Entwicklung des Epac1 spezifischen cAMP-Analogs 8-CPT-2-Me-cAMP macht es möglich zwischen Epac1 und PKA vermittelten Signalen zu unterscheiden (Enserink, 2002). Epac2 und Repac sind zwei weniger gut charakterisierte Epac-verwandete Austauschfaktoren (Bos, 2001).

CD-GEFs sind eine Familie von Austauschfaktoren mit unterschiedlicher Spezifität für die GTPasen der Ras-Subfamilie. Allen gemeinsam sind potentielle Bindestellen für Ca^{2+} und für DAG. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich sowohl in ihrer Sensitivität gegenüber diesen beiden *Second Messengern* als auch in dem Spektrum der regulierten GTPasen. CD-GEFI aktiviert Rap1 und R-Ras und wird *in vitro* allosterisch durch Ca^{2+} reguliert, kann aber nicht durch das DAG-Mimetika 12,13-Tetradecanoylphorbolacetat (TPA) an die Membran transloziert werden. Anders CD-GEFII und CD-GEFIII, welche durch TPA an die Membran rekrutiert werden, während sie insensitiv gegenüber erhöhten Ca^{2+} -Leveln sind. CD-GEFII (RasGRP) aktiviert Ras und R-Ras, CD-GEFIII hingegen Rap1, Rap2, Ras und R-Ras. Diese Daten lassen vermuten, das CD-GEFI für die Ca^{2+} -vermittelte und CD-GEFIII für die DAG – vermittelte Rap Aktivierung verantwortlich ist (Bos, 2001).

RA-GEFs (PDZ-GEFs) sind charakterisiert durch ihre PDZ-Domäne, eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Außerdem besitzen sie eine cAMP-Bindestelle mit schwacher Affinität, die wahrscheinlich der negativen Regulation dient. Interessanterweise besitzt PDZ-GEF1 nicht nur Rap-GEF-Aktivität sondern ist auch in der Lage über seine RA(*Ras/Rap association*)-Domäne Rap-GTP zu binden (Liao, 2001). Die RA-Domäne von Rap-GEF-2 bindet ausschließlich M-Ras. Aktives M-Ras kann RA-GEF-2 zur Plasmamembran rekrutieren und so Rap aktivieren (Gao, 2001).

2.3.2 GTPase-aktivierende Proteine

Rap1GAP und Rap1GAPII werden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) reguliert. $G_{\alpha i}$ -Untereinheiten rekrutieren Rap1GAPII, nicht aber Rap1GAP, zur Plasmamembran, was in einer Senkung des Rap-GTP Levels resultiert (Mochizuki, 1999). Rap1GAP dagegen assoziiert nur mit $G_{\alpha z}$, aber nicht mit anderen $G_{\alpha i}$ -Untereinheiten (Meng, 1999). Nur aktive GTP-gebundene $G_{\alpha i}$ und $G_{\alpha z}$ binden an Rap1GAPII bzw. Rap1GAP. $G_{\alpha o}$ -Untereinheiten dagegen assoziieren mit Rap1GAP bevorzugt im inaktiven Zustand. Interessanterweise führt dies in PC12 Zellen nicht zur Inhibierung sondern zur Aktivierung

von Rap und nachfolgend auch von Erk. Gαo könnten demnach Rap1GAP sequestrieren und dieses erst nach Aktivierung freisetzen (Jordan, 1999). Weitere weniger gut charakterisierte negative Regulatoren der Rap-Aktivität sind Spa-1, E6TP1, Tuberin und GAP^{IP4BP} (Bos, 2001). Spa-1 wurde kürzlich in Zusammenhang gebracht mit der Regulation von Aquaporin-2 und damit der Erhaltung der Körperwasserhomöostase. Der Transport von Aquaporin-2 zur apikalen Membran der Nierenzellen erfordert die Bindung von Spa-1 an Aquaporin-2. Dies wird sowohl durch eine Spa-1 Mutante ohne GAP-Aktivität als auch durch konstitutiv aktives Rap1 inhibiert (Noda, 2004).

2.3.3 Rap als Regulator der MAP-Kinase Erk

Die erste für Rap beschriebene Funktion war die Suppression der K-Ras induzierten Transformation von NIH3T3 Zellen (Kitayama, 1989). Darauf basierend wurde angenommen, dass Rap die Ras-vermittelte Erk-Aktivierung negativ reguliert. Dies wurde auch durch anfängliche Arbeiten unterstützt. So schwächt konstitutiv aktives Rap-G12V die durch EGF oder LPA induzierte Erk-Phosphorylierung in HEK293 Zellen deutlich ab, ohne dabei die Akkumulation von Ras-GTP zu beeinträchtigen (Cook, 1993). Aufgrund der starken Ähnlichkeit beider Effektorregionen binden Ras und Rap *in vitro*, wenn auch mit deutlich unterschiedlichen Affinitäten, an die gleichen Effektoren. Im Gegensatz zu Ras kann Rap c-Raf-1 nur binden, dieses aber *in vivo* nicht aktivieren. Rap hat demnach das Potential c-Raf-1 zu sequestrieren und so dessen Aktivierung durch Ras zu verhindern. Entsprechend wurde in HEK293 Zellen nach Rap-Aktivierung durch Forskolin eine verstärkte Assoziation an c-Raf-1, verbunden mit einer Reduzierung der EGF / Ras – induzierten Erk-Aktivierung, beobachtet (Schmitt, 2002). Zur vollen Aktivierung von Erk durch Ras kommt es sowohl nach Stimulation des Insulin-Rezeptors als auch des T-Zell-Rezeptors nur, wenn parallel auch gleichzeitig die Bildung von Rap-GTP eingeschränkt wird (Boussiotis, 1997; Okada, 1998). Die Befunde, die auf ein derartiges Sequestrierungsmodell hinweisen, beruhen allerdings auf der Überexpression von Rap und daher potentiell auch auf einer artifiziellen kompetitiven Inhibierung der Ras-Funktion. Gegen dieses Modell spricht, dass Rap durch eine Vielzahl von extrazellulären Signalen aktiviert wird, darunter mitogene Signale, wie PDGF und EGF, für welche die Ras-vermittelte Erk-Aktivierung typisch ist. Die PDGF induzierte Erk-Aktivierung in untransfizierten Rat-1 Zellen findet, trotz der gleichzeitigen Bildung von Rap-GTP statt. Auch eine Erhöhung des Rap-GTP Levels durch Behandlung mit TPA ist ohne Einfluss auf die PDGF-induzierte Phosphorylierung von Erk (Zwartkruis, 1998). Dies und eine Reihe weiterer Befunde (Christian, 2003; Sebзда, 2002) zeigt, dass endogenes Rap-GTP wahrscheinlich nicht direkt mit der Ras-vermittelten Erk-Aktivierung interferiert. Die heute bekannte Funktion von Rap1 bei der Integrin-vermittelten Zelladhäsion (siehe 2.3.4) legt außerdem den Verdacht nahe, dass die beobachtete Rap1-induzierte Abflachung

Ras-transformierter Zellen nicht mit der Inhibierung der Ras-Signaltransduktion, sondern vielmehr mit einer verstärkten Integrin-Adhäsion zu begründen ist (Bos, 2003).

In manchen Zelltypen ist Rap als positiver Regulator von Erk beschrieben. Dies wird durch die Raf-Isoform B-Raf, welche im Gegensatz zu c-Raf-1 durch Rap aktiviert werden kann, vermittelt. Ursache hierfür sind Unterschiede in der cystein-reichen Domäne (CRD), die neben der minimalen Ras/Rap-Bindedomäne (RBD) an der Bindung von Ras und Rap beteiligt ist. Der Austausch beider CRDs reicht aus um auch die Aktivierbarkeit durch Rap von c-Raf-1 und B-Raf zu vertauschen (Okada, 1999). Bei NGF-Stimulation von PC12 Zellen werden Ras und Rap mit unterschiedlichen Kinetiken aktiviert. Dabei ist Ras für die initiale Erk-Aktivierung verantwortlich. Dominant negatives Ras-S17N verhindert die Aktivierung innerhalb der ersten zehn Minuten, aber nicht die zu späteren Zeitpunkten. Die lang anhaltende Erk-Aktivierung wird durch Rap-S17N unterdrückt, benötigt also Rap-GTP. Interessanterweise kann man diesen beiden Prozessen auch unterschiedliche Zellantworten zuordnen. Die Rap-vermittelte lang anhaltende Erk-Aktivität führt zur neuronalen Differenzierung, während die transiente Ras-vermittelte Aktivität zum Auswachsen von Neuriten beiträgt (York, 1998).

Der Rap / B-Raf / Erk – Signalweg scheint sich auf Zelltypen zu beschränken, in denen Rap durch die cAMP-regulierte Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird (Bos, 2001). Nach aktivierender Src-Phosphorylierung durch PKA kann Src das Adaptorprotein Cbl phosphorylieren, welches daraufhin den Rap-Austauschfaktor C3G im Komplex mit Crk rekrutiert, woraufhin Rap-GTP gebildet wird (Schmitt, 2002). Zusätzlich kann Rap1 auch direkt von PKA phosphoryliert werden (Lerosey, 1991). Der Einfluss dieser Phosphorylierung auf die Aktivität von Rap ist allerdings noch unklar. PKA kann B-Raf auch unabhängig von Rap regulieren, so zum Beispiel durch Phosphorylierung einer Phosphatase, welche Erk negativ reguliert oder durch inhibierende Phosphorylierung von c-Raf. Dies wirft die Frage auf, ob die cAMP induzierte Rap-Aktivierung wirklich für die Regulation von Erk benötigt wird oder die Aktivierung von PKA ausreichend ist. Die Beantwortung wurde durch Entwicklung eines cAMP-Analogs, welches selektiv Epac aber nicht PKA aktiviert, möglich. In mehreren B-Raf exprimierenden Zelllinien aktiviert 8CPT-2Me-cAMP Rap via Epac, während 8-Br-cAMP sowohl Rap als auch PKA aktiviert. Trotz vergleichbarer Rap-Aktivierung induziert nur 8-Br-cAMP die Phosphorylierung von Erk. Folglich ist Rap-Aktivierung allein dafür nicht ausreichend. In manchen Zellen hat cAMP antiproliferative Wirkung. Die beschriebenen umstrittenen inhibitorischen Effekte von Rap auf Erk, könnte ebenfalls dadurch entstanden sein, dass Rap in diesen Zellsystem zwar aktiviert wird, die Erk-Inhibierung aber Rap-unabhängig durch PKA vermittelt wird (Enserink, 2002).

Ob und wie Rap an der Regulation von Erk beteiligt ist, wird noch kontrovers diskutiert. Ein Grund hierfür ist sicherlich die starke Abhängigkeit der beobachteten Effekte vom untersuchten Zelltyp. Zusätzlich wird die Interpretation einiger Ergebnisse dadurch erschwert, dass ektopisches Rap untersucht wurde oder die Rap-vermittelten Effekte nicht sicher von den PKA-vermittelten getrennt werden konnten.

Erk ist nicht die einzige MAP-Kinase, für die eine Regulation durch Rap beschrieben ist. Werden Fibroblasten durch äußere Kräfte gedehnt wird p38 Rap-abhängig aktiviert. Bei Kontraktion dagegen werden Rap und p38 deaktiviert (Sawada, 2001). Nach Öffnung von NMDA-Rezeptoren neuronaler Zellen werden AMPA-Rezeptoren von der Synapse entfernt, was in einer Langzeit-Depression genannten Zustand resultiert. Dies wird durch Rap1 und p38 vermittelt. Über NMDA-Rezeptoren kann auch der Ras / Erk –Signalweg eingeschaltet werden, was den gegenteiligen Effekt, eine Langzeit-Potentierung, verbunden mit der Anreicherung von AMPA-Rezeptoren in der Synapse, induziert (Zhu, 2002).

2.3.4 Rap in T-Zellen: Anergie und *Inside-out*-Signaltransduktion von Integrinen

Anergie

Die Antigen-induzierte Aktivierung des T-Zellrezeptors (TCR) führt zu einer Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen, die in der Aktivierung des T-Lymphocyts resultieren. Diese Aktivierung geht einher mit Produktion von IL-2, Proliferation und veränderten adhesiven Eigenschaften.

Neben einer Reihe anderer Signalproteine wird auch Rap1 bei TCR- Stimulation durch Bindung eines Antigen-MHC-Komplexes aktiviert. Auch hier wurde Rap1 zunächst eine negativ regulatorische Funktion zugeschrieben. Ursache hierfür war die Beobachtung, dass in anergen T-Zellen Rap-GTP akkumuliert (Boussiotis, 1997). Anerge T-Zellen entstehen, wenn T-Zellen ausschließlich über den TCR stimuliert werden. Für eine volle Aktivierung der T-Zellen werden weitere kostimulatorische Signale, zum Beispiel durch CD28-Ligation, benötigt. Das Ausbleiben dieser induziert einen Zustand der Nichtaktivierbarkeit (Anergie), indem die TCR-Signaltransduktion selbst in Anwesenheit kostimulatorischer Signale inhibiert ist. Anerge T-Zellen zeichnen sich unter anderem durch eine erhöhte Aktivität von Fyn, einer Kinase der Src-Familie, aus. Fyn ist konstitutiv an den TCR gebunden. In anergen T-Zellen assoziiert Fyn mit Cbl, einem Adaptorprotein mit E3-Ubiquitinligaseaktivität, welches wiederum CrkL im Komplex mit C3G binden kann. Die Rekrutierung des Rap-GEFs C3G führt zur Aktivierung von Rap1. Parallel zu dem erhöhten Rap1-GTP-Level wurde eine Inhibierung der Ras-Aktivierung, die für Induktion der IL-2 Expression nötig ist, beobachtet. Dies führte zu dem Modell, dass Rap1-GTP in anergen T-Zellen durch Sequestrierung des Ras-Effektors c-Raf-1 die Ras-vermittelte T-Zell-Aktivierung blockiert. Unterstützt wurde

dieses Model dadurch, dass die Ligation des kostimulatorischen Proteins CD28 die Bildung von Rap-GTP inhibieren kann und somit die ungehinderte Aktivierung von Ras ermöglichen könnte (Carey, 2000; Reedquist, 1998).

Andere Studien dagegen konnten keine antagonistischen Effekte endogener Rap-Aktivierung auf die Ras-Signaltransduktion feststellen. So ist zum Beispiel während der positiven T-Zell-Selektion im Thymus die Rap-Aktivität erhöht ohne dabei die gleichzeitige Erhöhung der Ras-Aktivität zu beeinflussen (Amsen, 2000). Auch die Analyse von transgenen Mäusen, die konstitutiv aktives Rap1A-G12V in ihren T-Lymphocyten exprimieren, zeigt Rap als einen positiven Regulator der T-Zell-Aktivierung. Die Entwicklung der T-Zellen war nicht beeinträchtigt. Anstelle einer verstärkten T-Zell-Anergie wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Verstärkung der TCR-Antwort beobachtet. Auch die TCR induzierte Erk-Aktivierung war durch die Rap1-G12V Expression unbeeinträchtigt (Sebzda, 2002).

Inside-out-Signaltransduktion von Integrinen

Eine Ras-unabhängige Rap-Funktion, die in den letzten Jahren etabliert wurde, ist dessen grundlegende Rolle in der Regulation der Integrin-vermittelten Zelladhäsion. Diese lässt sich in dauerhaft adherenten Zellen vor dem Hintergrund anderer Adhäsionsprozesse schwierig untersuchen. Viele Erkenntnisse liegen daher für T-Zellen vor, in denen die Integrin-vermittelte Adhäsion induziert werden kann. Die erste Beobachtung, die auf eine mögliche Rolle von Rap an Adhäsionsprozessen hindeutete, war, dass Spa1, ein GAP für Rap, die Adhäsion von HeLa-Zellen an Fibronectin inhibiert (Tsukamoto, 1999). Kurz darauf wurde die Beteiligung von Rap an der Inside-out-Signaltransduktion verschiedener Integrintyp nachgewiesen. Integrine sind transmembrane heterodimere Adhäsionsmoleküle, die aus einer von verschiedenen α -Ketten und einer aus mindestens fünf β -Ketten bestehen (Rangarajan, 2003). Je nach Zusammensetzung des Integrins werden unterschiedliche Liganden erkannt. Dies können unter anderem Adhäsionsmoleküle auf benachbarten Zellen, Proteine der extrazellulären Matrix oder aber opsonierte Partikel sein. Die Bindung eines Liganden kann zur Auslösung von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen führen. Dies wird als outside-in-Signaltransduktion bezeichnet. Umgekehrt spricht man von inside-out-Signaltransduktion, wenn durch intrazellulär generierte Signale die Integrin-vermittelte Adhäsion verstärkt wird. Dies kann zum einen durch Induktion einer erhöhten Affinität der Integrine für ihre Liganden und zum anderen durch sogenanntes Integrin-Clustering (erhöhte Avidität) geschehen. Konstitutiv aktives Rap1-G12V verstärkt die Bindung des Integrins LFA-1 (α L β 2) an das Adhäsionsmoleküle ICAM-1. Die Adhäsion an ICAM-1 kann auch durch Aktivierung des TCR induziert werden. Dies wird in Jurkat-T-Zellen durch dominant negatives Rap1-S17N inhibiert (Katagiri, 2000). Ebenfalls in Jurkat-T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die durch den Adhäsionsverstärker CD31 (PECAM-1) induzierte Adhäsion von

LFA-1 an ICAM-1 und VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) an VCAM-1 durch Rap1 vermittelt wird. Erhöhung der Rap-Aktivität durch Rap1A-G12V oder C3G führt zur Verstärkung der Adhäsion. Störung der Rap-Aktivierung durch Rap1A-S17N, Rap1GAP oder RalGDS-RBD dagegen inhibieren die CD31-induzierte Adhäsion (Reedquist, 2000). In Makrophagen sind Integrine auch an der Phagocytose von C3bi-opsonierten Partikel, die im Zuge der Komplement-Antwort markiert wurden, beteiligt. Das Integrin $\alpha M\beta 2$ (Komplementrezeptor CR3) kann durch verschiedene inflammatorische Signale (LPS, TNF- α , PAF) aktiviert werden. Auch diese Inside-out-Signaltransduktion wird durch Inhibierung der Rap-Aktivierung unterbrochen, benötigt also Rap-GTP (Caron, 2000). Zu vergleichbaren Ergebnissen kam auch die Untersuchung der Regulation weiterer Integrintypen, wie zum Beispiel $\alpha 5\beta 1$ (Arai, 2001) und $\alpha II\beta 3$ (Bertoni, 2002). Letzteres wird in Blutplättchen und deren Vorläufern, den Megakaryocyten, exprimiert und bindet Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor. Hier ist offensichtlich Rap1B für die erhöhte Integrin-Affinität nach Stimulation mit Thrombin nötig. Bisher wurde nur für eines aller untersuchten Integrine keine Regulation durch Rap festgestellt. Das Integrin $\alpha 6\beta 4$ unterscheidet sich von anderen Integrinen dadurch, dass es an das Intermediärfilamentsystem assoziiert und nicht wie andere Integrine an das Aktinfilament (Enserink, 2004). Dies unterstützt die Vermutung, dass Rap für das Aktinzytoskelett-abhängige Integrin-Clustering nötig ist (Price, 2004). Die Adhäsivität von Integrinen kann auch erhöht werden, ohne dass dabei Rap-GTP akkumuliert wird. Dies ist sowohl bei der TPA-induzierten Adhäsion als auch bei Integrin-Clustering, das durch Mn^{2+} oder Integrin-vernetzende Antikörper hervorgerufen wird, der Fall. Beide Prozesse sind jedoch sensitiv gegenüber der Blockierung der basalen Rap-Aktivität durch Rap1GAP oder RalGDS-RBD (de Bruyn, 2002).

Es sind zwar ein Vielzahl von extrazellulären Stimuli bekannt, die Rap aktivieren und somit Adhäsion stimulieren können, aber welche genauen Signalwege zur Bildung von Rap-GTP führen, ist nur im Ansatz erforscht. In Ovar3 Zellen führt die Aktivierung des $G_{\alpha s}$ -gekoppelten $\beta 2$ -adrenergen Rezeptors zur verstärkten Adhäsion an Fibronektin. Dafür ist die Bildung von cAMP gefolgt von der Aktivierung von Epac und anschliessender Rap-Aktivierung nötig (Rangarajan, 2003). In PLC- $\gamma 1$ -defizienten Jurkat-T-Zellen ist die TCR-induzierte Rap-Aktivierung und die Adhäsion an ICAM-1 stark reduziert. Beides kann wieder hergestellt werden, indem PLC- $\gamma 1$ expremiert wird. PLC- $\gamma 1$ produziert die *Second Messenger* DAG und IP3. Letzteres sorgt für die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Bei Überexpression des Ca^{2+} - und DAG – abhängigen Rap-Austauschfaktors CD-GEFI bindet und aktiviert dieser Rap1 verstärkt somit die TCR-induzierte Adhäsion (Katagiri, 2004b). Auch eine mögliche Beteiligung von Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) an der Rap-Aktivierung ist beschrieben wurden. Die durch Ligation des multifunktionellen Membranproteins CD98 hervorgerufene Rap-GTP-Bildung und LFA-1 – Adhäsion ist sensitiv gegenüber Inhibitoren der PI3-Kinasen (Suga, 2001).

Die Adhäsivität von Integrinen wird durch Veränderung ihrer Avidität oder ihrer Liganden-Affinität bzw. einer Kombination aus beiden reguliert. Über die Signaltransduktionprozesse, die diese beiden Phänomene mit der Aktivierung von Rap verbinden, ist nicht viel bekannt. Erst kürzlich konnte RAPL als Rap1-Effektor und wahrscheinliches Bindeglied zwischen Rap und der Integrinaktivierung identifiziert werden. RAPL wurde ursprünglich als Nore1b einem alternativem Spliceprodukt von *Rassf5* beschrieben. RAPL bindet GTP-abhängig an Rap und wird dadurch wahrscheinlich zu Integrinen rekrutiert, wo es dann, wie bisher zwar nur für LFA-1 gezeigt, direkt an die α -Kette binden kann (Katagiri, 2003). Auch der Phänotyp der RAPL – knock-out – Maus bestätigt, eine entscheidende Rolle in der Adhäsion von Immunzellen (Katagiri, 2004a). Die zentrale Funktion von Rap für der Integrin-vermittelte Adhäsion läßt vermuten, dass Rap nicht direkt Integrineigenschaften reguliert, sondern eher grundlegende Prozesse wie die Mobilität von Integrinen und Rezeptoren oder deren Anknüpfung an das Aktincytoskelett beeinflußt. In dieses Bild passt auch, dass Integrine, die nicht an das Aktincytoskelett assoziiert sind, auch nicht durch Rap aktiviert werden, während die Ausbildung Aktin-abhängiger E-Cadherin-basierter Zell-Zell-Kontakten durch Rap reguliert wird (Enserink, 2004; Price, 2004). In diesem Zusammenhang interessant ist auch der Rap-Effektor AF-6, welcher mit aktinbindendem Profilin assoziiert. AF-6 kann nicht nur Rap-GTP sondern auch Spa-1 binden und so die Rap-Aktivierung terminieren. Eine derartige regulatorische Rolle von AF-6 konnte für die β 1-Integrin-vermittelte Adhäsion gezeigt werden (Su, 2003).

2.3.5 Rap in B Zellen

Die am aktivierten B-Zell-Rezeptor (BCR) ausgelösten Signaltransduktionprozesse ähneln in Teilen denen des TCRs. Ein für die B-Zell-Proliferation entscheidender Schritt ist auch hier die Induktion des Ras / c-Raf-1 / MEK / Erk – Weges. Gleichzeitig wird auch Rap-GTP gebildet. Dies wird durch PLC- γ 1 und DAG vermittelt (McLeod, 1998). Unterbindet man die Rap-Aktivierung, ist dies ohne Einfluß auf die Erk-Aktivierung. Rap ist hier demnach kein negativer Regulator der Ras-Funktion. Vielmehr ist Rap auch in B-Lymphocyten für die Integrin-vermittelte Adhäsion (β 2- und β 4 Integrine), Migration und Aktinpolymerisation nötig. BCR aktiviert neben Rap1 auch Rap2. In B-Zellen wurde erstmalig gezeigt, dass auch konstitutiv aktives Rap2-G12V die B-Zell-Adhäsion verstärken kann (McLeod, 2003). Rap wird nicht nur durch den BCR aktiviert, sondern auch von Chemokin-Rezeptoren wie zum Beispiel CXCR4, den Rezeptor für das Chemoattraktans SDF-1. Dies ist für die chemotaktische Migration erforderlich (McLeod, 2002).

Eine Integrin-unabhängige Funktion von Rap in B-Zellen ist die Limitation antiapoptotischer Signale. Rap2-G12V bindet und inhibiert PI3K. Dies resultiert in einer verminderten Akt-Aktivierung und damit in der geschwächten Suppression der Expression des proapoptotischen Faktors p27^{Kip1} (Christian, 2003). p27^{Kip1} akkumuliert auch in Rap1-G12V transfizierten T-Zellen (Katagiri, 2002).

2.3.6 Rap und E-Cadherine

Rap1 ist nicht nur für die Regulation der Integrin-abhängigen Adhäsion verantwortlich. Kürzlich wurde auch die Beteiligung an der Ausbildung von E-Cadherin-basierten Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen. E-Cadherine sind transmembrane Adhäsionsmoleküle, die Ca^{2+} -abhängig homotypische Kontakte mit E-Cadherinen auf Nachbarzellen ausbilden. Sie sind von Bedeutung für die Ausbildung und den Erhalt fester Gewebe, die Wundheilung und die Invasivität von Tumorzellen (Price, 2004). Die extrazelluläre Vernetzung der E-Cadherine, wie sie bei initialen Zell-Zell-Kontakten an Filopodien auftritt, führt zur Aktivierung von Rap, vermutlich durch Bindung von C3G an E-Cadherin. Rap-GTP ist nötig für die weitere Rekrutierung von E-Cadherinen an den entstehenden Zell-Zell-Kontakt. Die Expression von Rap1GAP inhibiert die Bildung der Zell-Zell-Kontakte. Dieser Effekt kann durch konstitutiv aktives Cdc42 unterdrückt werden. Ein Hinweis darauf, dass Cdc42 an der Vermittlung der Rap-induzierten Effekte beteiligt ist (Hogan, 2004). Ein weiterer möglicher Regulator der E-Cadherin-Funktion ist DOCK4. Die Wiedereinführung von DOCK4 in murine Osteosarcoma Zellen, denen endogenes DOCK4 fehlt, führt zur Ausbildung von Adherens-Junctions und verminderter Tumorinvasivität. Gleiches wird durch Expression von konstitutiv aktiven Rap erreicht. Eine DOCK4-Mutante, die nicht mehr in der Lage ist Rap zu aktivieren, tritt in humanen Prostata- und Ovarial-Karzinomen auf.

2.4 Visualisierung von Signaltransduktionsprozessen

Die räumliche und zeitliche Auflösung von Signaltransduktionsereignissen ist derzeit eine der spannendsten Aufgabe der Signaltransduktionsforschung. Der größte Teil der bisherigen Kenntnisse beruht auf der Analyse von Zellen nach deren Lyse. Dies hat zwei entscheidende Nachteile. Einerseits gehen räumliche Informationen verloren, andererseits erhält man immer nur einen Durchschnitt über mehrere Zellen, was besonders bei heterogenen Zellpopulationen kritisch sein kann. Letzteres trifft auch für die Messung von zellulären Reaktionen wie Proliferation, Migration und Adhäsion zu. Bei Methoden, die Zelllyse erfordern, ist auch die zeitliche Auflösung begrenzt, da hier nur einzelne Zeitpunkte gemessen werden können.

Die Entdeckung und Optimierung von fluoreszenten Proteinen begleitet von der technischen Weiterentwicklung mikroskopischer Methoden in den letzten Jahren, war grundlegend für die ersten Erfolge der räumlich-zeitlichen Analyse von intrazellulären Prozessen. Das Grün-fluoreszierende-Protein (GFP) wurde 1992 aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert (Prasher, 1992). Ausgehend von Wildtyp-GFP wurden inzwischen mehrere Proteine mit höherer Fluoreszenzintensität und auch unterschiedlichen spektralen Eigenschaften entwickelt. DsRed1 ist ein weiteres für den zellbiologischen Einsatz optimiertes fluoreszentes Protein, welches ursprünglich aus der Seeanemone *Discosoma sp.* isoliert wurde. Dieses Set an Fluoreszenzmarkern erlaubte die Entwicklung vielfältiger Methoden zur mikroskopischen Analyse der Lokalisation, Interaktion und Aktivierung von Proteinen (Zhang, 2002).

Der naheliegendste Einsatz von Fluoreszenzmarker ist die Analyse der zellulären Lokalisation von Proteinen. Dabei wird das Protein von Interesse gentechnisch zum Beispiel an GFP gekoppelt, so in Zellen exprimiert und anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Die Auflösung subzellulärer Strukturen wird dabei erheblich durch den Einsatz konfokaler Mikroskopie verbessert. Diese erlaubt es nur eine bestimmte Ebene der Zelle zu beobachten. Dabei sind optische Schnitte von einem Mikrometer und weniger üblich. Durch Verwendung unterschiedlicher Fluorophore ist es auch möglich mehrere Proteine nebeneinander zu beobachten. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass die Adaptorproteine Grb2 und Shc am aktivierten EGF-Rezeptor auch nach dessen Internalisierung assoziiert bleiben. CFP (*Cyan-fluorescent-protein*)-markiertes Grb2 und YFP (*Yellow-fluorescent-protein*)-markiertes Shc befinden sich nach Stimulation des EGF-Rezeptors gemeinsam in endosomalen Vesikeln, diese enthalten auch das zur Stimulation verwendete Rhodamin-markierte EGF (Jiang, 2002).

Derartige Untersuchungen erfordern die Überexpression des Proteins von Interesse und erlauben daher nur einen bedingten Rückschluss auf das Verhalten endogener Proteine. Eine alternative und weit verbreitete Methode zur Analyse der Lokalisation von endogenen Proteinen ist deren immunocytochemischer Nachweis mittels spezifischer Antikörper.

Entscheidender Nachteil dieser Technik ist die damit verbundene Fixierung der Zellen. Dies limitiert stark die zeitliche Auflösung und kann außerdem zur teilweisen Zerstörung von zellulären Strukturen führen.

2.4.1 Visualisierung der Aktivierung von Ras-GTPasen

Möglichkeiten zur Detektion von bestimmten Aktivierungszuständen von Proteinen sollen im Folgenden beispielhaft an den kleinen GTP-bindenden Proteinen der Ras-Subfamilie dargestellt werden. Viele Signalproteine leiten Signale dadurch weiter, dass sie nur im aktiven Zustand an nachgeschaltete Proteine binden, welche über Domänen verfügen, die selektiv die aktivierte Form erkennen. Solche aktivierungsspezifischen Domänen können als Reportersonden verwendet werden. Im Falle von Ras ist dies die für den GTP-gebundenen Zustand spezifische Ras-Bindedomäne (RBD) von c-Raf-1. Der einfachste Ansatz zur Detektion von aktiviertem Ras ist demnach die Expression GFP-gekoppelter RBD. Entsteht irgendwo in der Zelle Ras-GTP erwartet man, dass auch die GFP-RBD an diesen Stellen akkumuliert. Dies ist in Zellen, die Ras überexprimieren, erfolgreich angewandt worden. In ruhenden Cos-1 Zellen verteilt sich GFP-RBD homogen im Cytosol und im Nucleoplasma. Konstitutiv aktives Ras-Q61L, nicht aber dominant negatives Ras-S17N, rekrutiert GFP-RGR sowohl an die Plasmamembran als auch an den Golgi. Diese Verteilung kann auch durch EGF-Stimulation Ras exprimierender Zellen induziert werden, dabei erfolgt die Aktivierung an der Plasmamembran schnell und transient während Golgi-lokalisiertes Ras verzögert aktiviert wird (Chiu, 2002). Durch Rekrutierung von GFP-RGR konnte auch in Ras-transfizierten Jurkat-T-Zellen die Aktivierung von Ras am Golgi gezeigt werden. Dafür ist die Src-abhängige Aktivierung von PLC- γ 1 nötig. Die damit verbundene Freisetzung von Ca^{2+} und DAG führt zur Translokation von RasGRP1 zum Golgi und so zur Aktivierung von Ras. Interessanterweise kann Ca^{2+} gleichzeitig das Ras-GAP CAPRI an der Plasmamembran aktivieren und dort die Aktivierung von Ras unterdrücken (Bivona, 2003). Inwieweit die Aktivierung von Golgi-lokalisiertem Ras von physiologischer Relevanz ist oder nur durch Ras-Überexpression hervorgerufen wird, ist noch Gegenstand von Diskussionen. So wird zum Beispiel weder in normalen NIH3T3-Zellen noch in Ras-transformierten NIH3T3 mit leicht erhöhtem Ras-Spiegel eine Aktivierung von Ras am Golgi beobachtet. Die PDGF-induzierte Ras-Aktivierung beschränkt sich hier auf die Plasmamembran und dort vor allem auf Bereiche mit *Membrane Ruffling*. Für den Ras-GTP Nachweis wurde hier nicht nur die RBD sondern zusätzlich auch noch die Cystein-reiche Domäne (CRD) von c-Raf-1 verwendet, was

in einer stärkeren Bindung an Ras resultiert (Bondeva, 2002). Analoge Reportersonden wurden auch für GTPasen der Rho-Familie entwickelt. Die für die GTP-Form spezifische Bindedomäne wird hier als CRIB (*Cdc42/Rac1 interactive binding motif*) bezeichnet. So wurde zum Beispiel die CRIB der Kinase PAK zur Detektion von ektopischem Rac1-GTP in Neutrophilen erfolgreich eingesetzt (Srinivasan, 2003).

Ein Problem bei den bisher beschriebenen Translokalisations-basierten Aktivierungsstudien ist, dass meistens nur ein geringer Anteil der fluoreszenten Reportermoleküle an aktivierte GTPasen rekrutiert wird. Das ist unter Umständen nur schwer vor dem Hintergrund an freien Reportern nachzuweisen. Dies kann umgangen werden wenn das gemessene Signal, wie bei FRET-basierten Methoden, nur bei Interaktion beider Proteine auftritt. FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) ist ein strahlungsloser Transfer der Anregungsenergie von einem zuvor angeregtem Donor-Fluorophor auf einen Akzeptor-Fluorophor. Die Effizienz des Energietransfers ist dabei stark abhängig vom Abstand beider Fluorophore, dieser darf nur wenige Nanometer betragen. CFP und YFP besitzen die nötigen spektralen Eigenschaften für ein FRET-Paar. Markiert man zwei potentielle Interaktionspartner mit CFP bzw. YFP, so kann man deren Assoziation anhand des FRET-Signals verfolgen.

Rac1 war die erste GTPase deren Aktivierung in lebenden Zellen mittels FRET nachgewiesen werden konnte. Dazu wurde PAK-CRIB mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa546 markiert und in GFP-Rac1 transfizierte Swiss3T3 Zellen mikroinjiziert. Kratzt man eine „Wunde“ in eine konfluente Zellschicht, beginnen Zellen am Rand der „Wunde“ in diese einzuwandern. Dabei wurde FRET, also Rac1-Aktivierung, ausschließlich an dem sich vorwärts bewegendem Teil der Zelle beobachtet. Eine derartige polarisierte Rac1-Aktivierung tritt nicht bei Zellen im Inneren der Zellschicht auf (Kraynov, 2000). Nach EGF-Stimulation von A431 Zellen konnte FRET zwischen CFP-Ras und YFP-RBD sowohl in *Membrane Ruffles* an der Plasmamembran als auch an endosomalen Vesikeln beobachtet werden. Dabei enthalten die endosomalen Vesikeln zu mindestens teilweise auch ligandengebundenen EGF-Rezeptor (Jiang, 2002).

Ein eleganter Ansatz zur Verfolgung der Ras-Aktivierung, der die nachteilige Überexpression von Ras umgeht, ist die Verwendung so genannter Raichu-Sonden (*Ras and interacting protein chimeric unit*). Raichu-Ras ist ein Fusionsprotein bestehend aus Ras und RBD, welches von YFP und CFP flankiert wird. Durch GTP-Beladung von Ras kommt es zur intramolekularen RBD-Bindung, wodurch YFP und CFP in einen für FRET geeigneten Abstand gebracht werden. Das Vorhandensein von YFP und CFP auf einem Molekül bringt mit sich, dass beide in festem stöchiometrischem Verhältnis vorliegen und gleiche zelluläre Verteilung aufweisen. Dies senkt die Fehleranfälligkeit der FRET-Messung deutlich. Für die Funktionstüchtigkeit von Raichu-Ras ist die Membranverankerung über die C-terminal eingeführte CaaX-Sequenz essentiell. Raichu-Ras weist nicht direkt Ras-GTP nach, sondern

zeigt vielmehr die Balance zwischen aktivierender Ras-GEF und inaktivierender Ras-GAP Aktivität. Neben Raichu-Ras sind inzwischen Raichu-Sonden für Rap, Cdc42, Rac1, Rho und RalA entwickelt wurden. Sowohl in EGF stimulierten Cos-1 Zellen als auch in NGF stimulierten PC12 Zellen tritt Ras-Aktivierung zuerst an der Zellperipherie auf und breitet sich dann ins Zellinnere aus. Im Gegensatz dazu beginnt die Aktivierung von Rap an Endomembranen im Zellinneren (Mochizuki, 2001). Mittels Raichu-Ras konnten auch neue Erkenntnisse zur lateralen Ausbreitung der Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) gewonnen werden. Dieses Phänomen wurde bei der lokalen Stimulation von EGFR-transfizierten MCF7 Zellen mittels EGF-gekoppelter Beads beobachtet. Dabei breitet sich die EGF-Rezeptor-Phosphorylierung von der Stelle der ersten Aktivierung lateral über die gesamte Zelle aus (Verveer, 2000). Sawano et. al verwendeten zur lokalen Stimulation einen laminaren Fluss an Rhodamin-markiertem EGF. Interessanterweise zeigt Raichu-Ras eine Ausbreitung der Ras-Aktivierung über die gesamte Zelle nur in EGFR-transfizierten nicht aber in normalen Cos-1 Zellen (Sawano, 2002). Zur lateralen Ausbreitung des EGF-Signals kommt es demnach erst, wenn eine kritische Rezeptordichte überschritten wird. Dies zeigt auch, die starke Abhängigkeit der Signaltransduktion von der Konzentration der beteiligten Proteine, und ist ein gutes Beispiel dafür, wie wichtig es ist Signaltransduktionsprozessen unter möglichst endogenen Bedingungen zu untersuchen.

Auch die vorher durch FRET gezeigte Aktivierung von Rac1 während der Migration von Zellen (Kraynov, 2000) konnte mit Raichu-Rac1 bestätigt werden. In migrierenden HT1080 Zellen wurde mit Raichu-Sonden sowohl die Aktivierung von Rac als auch die Aktivierung von Cdc42 an der sich ausbreitenden Zellfront beobachtet. Das FRET-Signal sinkt sofort, sobald die Zelle ihre Richtung ändert. Genauere Analyse zeigt, dass die Stellen der Rac1- und Cdc42-Aktivierung nicht identisch sind. Während Cdc42 direkt an der sich ausbreitenden Zellfront aktiviert wird, erfolgt die Rac1-Aktivierung in einem diffuseren Bereich kurz dahinter (Itoh, 2002). Auch an der NGF-induzierten Ausbildung von Neuriten in PC12 Zellen sind Rac1 und Cdc42 beteiligt. Hier wurden ebenfalls Unterschiede im Muster der Aktivierung beider GTPasen festgestellt (Aoki, 2004). Raichu-Sonden wurden außerdem erfolgreich angewendet, um die Beteiligung von RalA an der Ausbildung von Lamellipodien (Takaya, 2004) und die sowohl räumlich als auch zeitlich unterschiedliche Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 während der Zellteilung zu visualisieren (Yoshizaki, 2003).

Mit den hier beschriebenen Varianten zur Visualisierung der GTPase-Aktivität, ist es gelungen wichtige neue Erkenntnisse zum räumlich-zeitlichen Ablauf von Signaltransduktionsereignissen zu gewinnen. Trotzdem sind alle Methoden mit unterschiedlichen Nachteilen behaftet, dies sind vor allem, Überexpression der untersuchten Proteine, ungeeignete zelluläre Verteilung der verwendeten Reportersonden und technische Limitationen, wie ungünstiges Signal-Hintergrund-Verhältnis und geringe Auflösung

zellulärer Strukturen. Dies wird in zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen deutlich. Die wohl stärkste Einschränkung der Aussagekraft bezüglich der physiologischen Relevanz der erhaltenen Ergebnisse ist die Analyse von überexprimierten Proteinen. Eine in diesem Zusammenhang umstrittene Frage ist zum Beispiel die Rolle der Aktivierung von Golgi-lokalisiertem Ras. Die Verwendung von Raichu-Ras erfordert keine Überexpression von Ras. In diesem Fall wurde auch keine Ras-Aktivierung am Golgi beobachtet. Allerdings bergen die Raichu-Sonden andere Probleme. Einige der von Matsuda et al. konstruierten Konstrukte tragen C-terminal die CaaX-Sequenz von K-Ras4B und nicht die der untersuchten GTPasen. Demnach könnte die subzelluläre Verteilung von GTPase und Raichu-Reporter variieren. Auch in der Auflösung von zellulären Strukturen wie z.B. endosomalen Vesikeln sind die Raichu-basierten Aufnahmen anderen konfokal-mikroskopischen Methoden unterlegen.

Eine überzeugende Visualisierung der endogenen Aktivierung ist bisher nur für Cdc42 gelungen. Der Reporter GFP-WASP-CRIB wird etwa eine Stunde nach Adhäsion von MCF7 Zellen an sich ausbildende E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte rekrutiert. Da sich der Großteil der ungebundenen GFP-WASP-CRIB im Inneren der Zelle befindet, kann die Rekrutierung an die Zellperipherie nahezu hintergrundfrei nachgewiesen werden. Eine perinucleäre Cdc42-Aktivierung in vergleichbarer Stärke, wäre wahrscheinlich nicht sichtbar (Kim, 2000).

Vorteil FRET-basierter Methoden ist ein relativ geringer Hintergrund, da Signale erst bei Bindung von Reporter und GTPase entstehen. Dagegen haben Methoden, die auf Reporter-Rekrutierung beruhen, den Vorteil, dass sie auf Überexpression des Zielproteins verzichten können. Eine Strategie, die beide Vorteile vereint, wurde kürzlich erstmals für Cdc42 angewandt. Dazu wurde in die WASP-CRIB ein Cystein eingeführt und an dieses der solventochrome Merocyanin-Farbstoff I-SO gekoppelt. Der Farbstoff wurde so positioniert, dass sich bei Bindung von Cdc42 dessen chemische Umgebung ändert, worauf dieser mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität reagiert. Um den durch Cdc42-Bindung induzierten Fluoreszenzanstieg von dem durch andere Faktoren, wie unterschiedlich Zelldicke, verursachten Anstieg zu unterscheiden, wurde die Sonde zusätzlich mit GFP markiert. Dies erlaubt die Normalisierung der gemessenen I-SO-Fluoreszenz gegen das GFP-Signal. Auf diese Art wurde eine basale Cdc42-Aktivierung an Zellfortsätzen unstimulierter MEF/3T3 Zellen beobachtet. Die Rekrutierung der Sonde allein reichte für die Visualisierung nicht aus, weder das GFP-Signal noch das des Farbstoffes I-SO lassen eine Akkumulation der Sonde über Hintergrundniveau erkennen. Der Assoziations-induzierte Fluoreszenzanstieg des Reporters kann nicht nur zur Visualisierung genutzt werden, sondern anstelle der standardmäßigen verwendeten GST-CRIB-Pulldowns auch zur fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung der Cdc42-Aktivität in Zelllysaten (Nalbant, 2004).

2.4.2 Visualisierung der Lokalisation und Aktivität von Rap

Die ersten Arbeiten, die sich mit der subzellulären Lokalisation von Rap1 beschäftigten, wiesen Rap1 immunocytochemisch im Golgi (Beranger, 1991) oder in endosomalen Vesikeln (Pizon, 1994) nach. In ruhenden Neutrophilen wurden Rap1 und Rap2 hauptsächlich in bestimmten exocytotischen Vesikeln, so genannten spezifischen Granula, gefunden. Zusätzlich befindet sich ein geringer Pool an Rap auch in der Plasmamembran. Bei Behandlung der Neutrophilen mit PMA oder einem Ca^{2+} - Ionophor, kommt es sehr schnell zur Fusion der Granula mit der Plasmamembran, was in einer stark erhöhten Plasmamembranlokalisation von Rap resultiert. Der immunocytochemische Nachweis wurde hier auch durch Membranfraktionierung und elektronenmikroskopische Methoden bestätigt (Maridonneau-Parini, 1992; Quinn, 1992).

Man geht davon aus, dass für die unterschiedliche Verteilung von Ras und Rap vor allem deren posttranslationale Modifikation verantwortlich ist. Daneben wurde kürzlich eine Sequenz innerhalb von Rap und Ras identifiziert, die offenbar für ihre korrekte Lokalisation entscheidend ist. In Cos-7 Zellen befindet sich Ras in der Plasmamembran und im Golgi, während Rap kaum in der Plasmamembran sondern hauptsächlich in vesikulären Strukturen und im Golgi anzutreffen ist. Überraschenderweise nimmt Ras die Lokalisation von Rap ein, sobald man die Aminosäuren 85-89 durch die entsprechenden Aminosäuren der Rap-Sequenz ersetzt. Die mechanistischen Grundlagen dieses Phänomens sind nicht bekannt (Nomura, 2004).

Die Frage, wo in der Zelle unter bestimmten Bedingungen Rap-GTP gebildet wird, wurde bisher durch drei verschiedene Methoden adressiert.

In unstimulierten humanen Megakaryocyten befindet sich Rap1 und Rap2 im Cytosol, vermutlich gebunden an α -Granula. Nach Stimulation der Zellen mit Thrombin wird Rap innerhalb einer Minute an die Membran transloziert. Rap-GTP entsteht dabei ausschließlich an der Plasmamembran. Gezeigt werden konnte dies an fixierten Zellen, welche erst mit GST-RGR und anschließend mit fluoreszenz-markiertem anti-GST-Antikörper behandelt wurden (Balduini, 2004 und Abb. 2.2 A). Entscheidender Nachteil der Methode ist natürlich, dass sie nicht die zeitliche Verfolgung der Rap-Aktivierung in lebenden Zellen erlaubt.

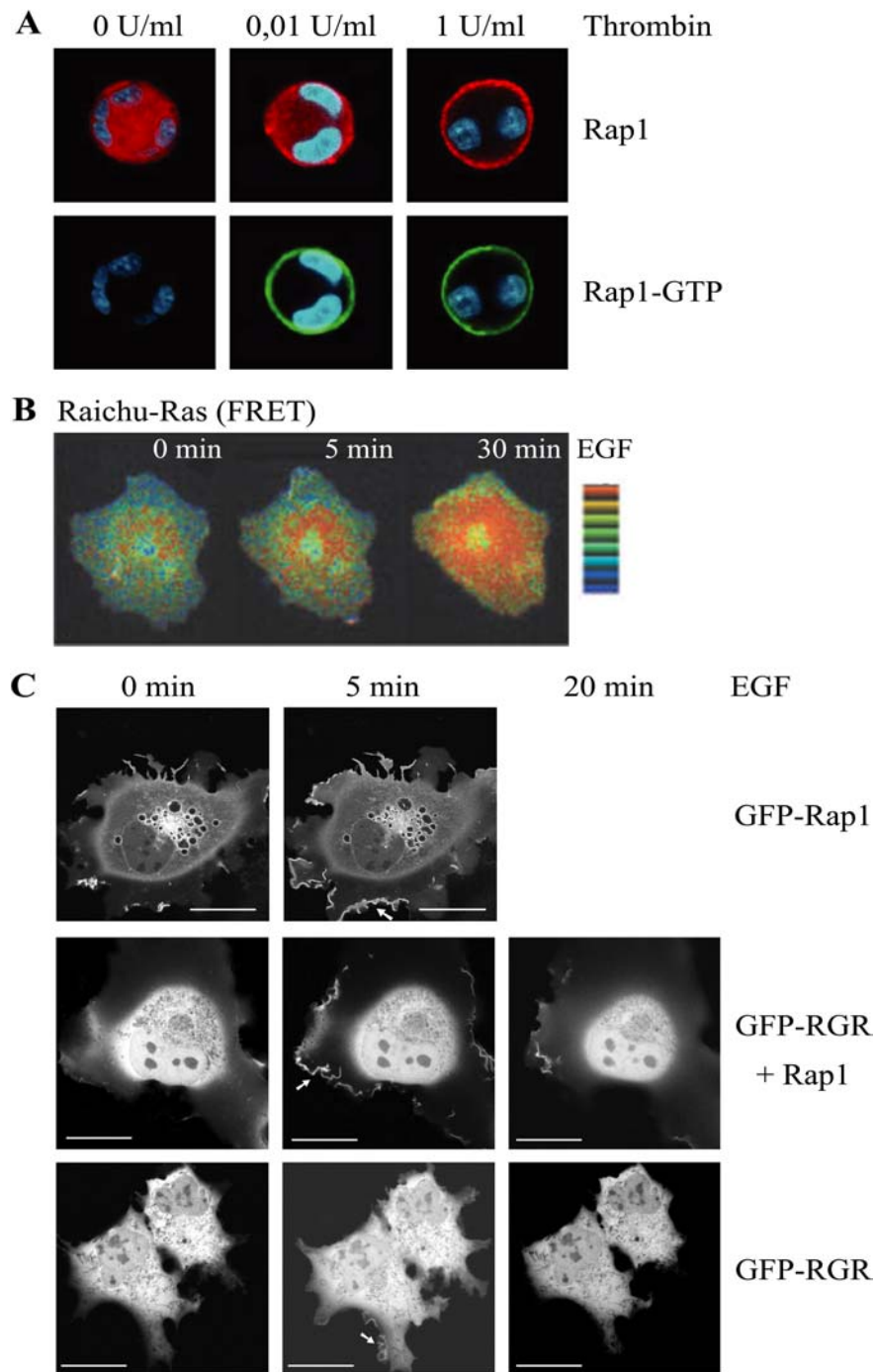


Abb. 2.2 Visualisierung der Aktivierung von Rap

(A) Megakaryocyten wurden für 1 min mit Thrombin stimuliert und daraufhin fixiert. Doppelfärbung mit anti-Rap1 (rot, Rap gesamt) und GST-RGR (grün, Rap1-GTP). Abgebildet wie in Fig. 4 (Balduini, 2004) mit Copyright-Erlaubnis von Elsevier Inc. und des Autors.

(B) EGF-Stimulation (5 ng/ml) von Raichu-Rap exprimierenden Cos-1 Zellen. Abgebildet wie in Fig. 2A (Mochizuki, 2001) mit Copyright-Erlaubnis der Nature Publishing Group und des Autors.

(C) EGF-Stimulation von Cos-1 Zellen (100 ng/ml) resultiert in der Translokation von GFP-Rap1 an die Plasmamembran (oberes Panel). Plasmamembran lokalisiertes Rap ist aktiv, wie durch GFP-RGR Rekrutierung zu überexprimierten Rap1-GTP (mittleres Panel) und zu endogenem Rap1-GTP (unteres Panel) angezeigt. Abgebildet wie in Fig. 3A und Fig. 5A (Bivona, 2004) mit Copyright-Erlaubnis der Rockefeller University Press und des Autors.

Auch die Aktivierung von Rap wurde mit den oben beschriebenen Raichu-Sonden untersucht. Nach Stimulation von Cos-1 Zellen mit EGF und PC12 Zellen mit NGF, zeigt Raichu-Rap eine Aktivierung die sich ausgehend vom perinucleärem Bereich ausbreitet. Eine Aktivierung an der Plasmamembran, wie für Ras beobachtet, tritt nicht auf (Mochizuki, 2001 und Abb. 2.2 B).

Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu einer Arbeit, die GFP-RGR als Reporter für Rap-GTP verwenden. Hier wird die Aktivierung von Rap1 in EGF-stimulierten Cos-1 Zellen nur an der Plasmamembran beobachtet. Dies ist mit der Translokation von Rap1 an die Plasmamembran verbunden. Verhindert man endosomales Recycling durch Inkubation mit NEM oder Koexpression von dominant negativem Rab11-Bindeprotein, so bleibt sowohl die Translokation als auch die Aktivierung von Rap aus. Demnach kann auch in Fibroblasten die Konzentration von Rap1 in der Plasmamembran, wie schon für hämatopoietische Zellen beschrieben, durch Exocytose schnell erhöht werden. Die hier erhaltenen Daten zur Rap-Aktivierung beruhen fast ausschließlich auf der Beobachtung von überexprimiertem Rap. Der Nachweis von endogenem Rap-GTP durch GFP-RGR gelingt nur unbefriedigend (Bivona, 2004 und Abb. 2.2 C).

3. Zielstellung

Die Aktivierung der kleinen GTPase Rap ist ein häufiges Ereignis der intrazellulären Signaltransduktion und wird durch eine Vielzahl verschiedenster extrazellulärer Stimuli induziert. Durch Regulation von Integrinen, Rho-GTPasen, E-Cadherinen und MAP-Kinasen ist Rap beteiligt an zellulären Prozessen wie der Adhäsion, Migration, Zell-Zell-Kontakt und der Proliferation. Der aktive Zustand von Rap zeichnet sich durch die Bindung von GTP aus. Der spezifische Nachweis von aktivem GTP-beladenem Rap in lebenden Zellen gelang bisher nur mit überexprimiertem Rap. Für Rap und für viele andere Proteine sind aber Beispiele bekannt, wo unter Überexpressionsbedingungen erhaltene Daten zu Fehlinterpretationen führten und nicht oder nur bedingt auf die endogene Situation übertragbar waren. Eine Reportersonde, welche endogenes Rap-GTP verlässlich nachweisen kann, wäre demnach ein wertvolles Werkzeug zur räumlich und zeitlichen Auflösung der Rap-Aktivierung in lebenden Zellen.

Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, ...

- ... ausgehend von der RalGDS – Rap-Bindedomäne (RGR) durch Oligomerisierung und Mutation eine multivalente Rap-GTP – spezifische Reportersonde zu entwickeln,
 - ... deren Fähigkeit zur räumlich-zeitlichen Auflösung extrazellulär stimulierter endogener Rap-Aktivierung an einem Beispiel zu verdeutlichen,
 - ... die Aktivierung von Rap parallel mit der Translokalisierung von Rap zur Plasmamembran in lebenden Zellen zu visualisieren.
-

4. Material und Methoden

Die im Folgenden dargestellten Versuche, wurden in einem molekularbiologischem Labor der Sicherheitsstufe 1 mit dafür üblicher Ausstattung durchgeführt. Chemikalien und Geräte, die zur Grundausstattung eines Labors zählen, werden daher nicht im Einzelnen aufgeführt. Die Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. bezogen und Lösungen, soweit nicht anders angegeben, mit Reinstwasser (MilliPore) angesetzt. Bei speziellen Geräten und Chemikalien, deren Verwendung das Versuchergebnis beeinflussen könnte, wird auf Hersteller bzw. Bezugsquelle hingewiesen.

4.1 Materialien

4.1.1 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> XL1 Blue	zur Amplifikation von Plasmiden
<i>E.coli</i> Rosetta TM (DE3) pLysS	zur Überexpression von Proteinen (Novagen)

4.1.2. Eukaryontische Zelllinien

Cos-7	Epithelzellen aus der Affeniere
PAE PDGFR β -WT	Endothelzellen aus der Aorta des Schweins (porcine arotic endothial), stabil transfiziert mit humanen PDGF-Rezeptor β (Ronnstrand, 1992)
PAE PDGFR β -Y _{1009/1021} F	stabil transfiziert mit humanen PDGF-Rezeptor β Y1009F / Y1021F (Ronnstrand, 1992)

4.1.3 Antikörper

anti-Phospho-p44/42 MAPK(T202/Y204)	Maus, monoklonal (Cell Signaling Tech.)
anti-pan-Erk	Maus, monoklonal (BD Transduction Laboratories)
anti-GFP (B-2)	Maus, monoklonal (Santa Cruz Biotechnology)
anti-pan-Ras (Ab-4)	Maus, monoklonal (Oncogene)
anti-Rap1 (121)	Kaninchen, polyklonal (Santa Cruz Biotechnology)

Anti-pan-Erk wurde 1:5000, alle anderen primären Antikörper 1:1000 in TBS-T, 1,5 % BSA verdünnt.

anti-Maus IgG-HRP	Ziege (Santa Cruz Biotechnology)
anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege (Santa Cruz Biotechnology)

Die beiden sekundären Antikörper wurden 1:10000 in TBS-T, 1,5 % BSA verdünnt.

4.1.4 Plasmide

Alle hier aufgeführten Expressionsvektoren enthalten Gene humanen Ursprungs.

Verwendete Plasmide

Eukaryontische Expression

Rap1A pRK5 *

pDsRed1-C1 (eukaryontische Expression DsRed1-markierter Proteine)

Ha-Ras-G12V	Ha-Ras-S17N	M-Ras-Q71L
Ha-Ras-G12V / C186S	Ki-Ras-G12V	TC21-Q72L

Fluoreszenzmarker für Zellkompartimente

Nucleus pECFP	3 Kopien der Kernlokalisationssequenz des SV40 Large Antigen (Clontech)
Golgi pECFP	1,4-Galaktosyltransferase (Aminosäuren 1-81) (Clontech)
ER pECFP	Calreticulin-ER-Lokalisationssequenz-ECFP-KDEL; (Clontech)
SARA-FYVE pECFP #	Marker für frühe Endosomen (PI(3)P bindende Domäne)
EEA1 pEGFP #	Endosomen Marker

Bakterielle Expression zur Proteinaufreinigung

RGR97 pGEX-4T3	NF1-cat pGEX-4T3	Rap1GAP pRSET B §
----------------	------------------	-------------------

Für Klonierungen verwendete Ausgangsplasmide

myc-Rap1A pcDNA3 *	Rap2A pcDNA3 *	pRSET B (Invitrogen)
Rap1A-G12V pRK5 *	pDsRed1-C1 (Clontech)	
Rap1A-S17N pRK5 *	pEGFP-C2 (Clontech)	

* Entsprechend markierte Plasmide wurden von J. de Gunzburg (Curie-Institut, Paris) zur Verfügung gestellt.

Entsprechend markierte Plasmide wurden von S. Corvera (University of Massachusetts) zur Verfügung gestellt.

§ Entsprechend markierte Plasmide wurden von J. Meng (Duke University, Durham) zur Verfügung gestellt.

Im Zuge der Arbeit klonierte PlasmidepRSET B (bakterielle Expression (His)₆-markierter Proteine)

Rap1A	RGR-K28A	RGR-K48A
RGR-WT	RGR-K28D	RGR-K48D
RGR-R16A	RGR-K44A	RGR-H49A
RGR-R16D	RGR-K44D	RGR-H49D
RGR-WT-1 *	RGR-WT-2	RGR-WT-3
RGR-R16A-1 *	RGR-R16A-2	RGR-R16A-3
RGR-K44A-1 *	RGR-K44A-2	RGR-K44A-3
RGR-K48D-1 *	RGR-K48D-2	RGR-K48D-3
RGR-H49A-1 *	RGR-H49A-2	RGR-H49A-3

* Zur Klonierung der di- und trimeren Bindedomänen war es nötig die monomere Bindedomäne erneut in pRSET B zu klonieren. Die gekennzeichneten Konstrukte unterscheiden sich von den oben aufgeführten durch einen anderen Insertionsort des RGR-Genes.

pEGFP-C2 (eukaryontische Expression EGFP-markierter Proteine)

RGR-WT-1 *	RGR-WT-2	RGR-WT-3
RGR-R16A-1 *	RGR-R16A-2	RGR-R16A-3
RGR-K44A-1 *	RGR-K44A-2	RGR-K44A-3
RGR-K48D-1 *	RGR-K48D-2	RGR-K48D-3
RGR-H49A-1 *	RGR-H49A-2	RGR-H49A-3

pDsRed1-C1 (eukaryontische Expression DsRed1-markierter Proteine)

Rap1A	Rap1A-G12V/C181S	Rap2B
Rap1A-G12V	Rap2A	Rap2B-G12V *
Rap1A-G12V/D38K	Rap2A-G12V	

Rap1A-S17N (Klon A) kloniert ausgehend von Rap1A-S17N pRK5

Rap1A-S17N (Klon B) kloniert ausgehend von Rap1A pDsRed1-C1

* In Rap2B-G12V pDsRed1-C1 wurden durch Verwendung der für Rap2A designten Primer Rap1A-G12V-f und Rap1A-G12V-r neben der G12V-Mutation zwei zusätzliche stille Mutationen eingeführt (Basenpaar 37-42: GGC GTG → GGG GTA)

4.1.5. Oligonukleotide

Klonierung der RGR-Mutanten in pRSET B

pRSETB.f	CGA CTC ACT ATA GGG AGA CC
pRSETB.r	CTC AAG ACC CGT TTA GAG G
RGR97-R16A.f	CGA CTG CTG TAT CAT CGC CGT CAG CCT GGA CG
RGR97-R16A.r	CGT CCA GGC TGA CGG CGA TGA TAC AGC AGT CG
RGR97-R16D.f	CGA CTG CTG TAT CAT CGA CGT CAG CCT GGA CG
RGR97-R16D.r	CGT CCA GGC TGA CGT CGA TGA TAC AGC AGT CG
RGR97-K28A.f	GGA CAA TGG CAA CAT GTA CGC GAG CAT CCT GGT GAC C
RGR97-K28A.r	GGT CAC CAG GAT GCT CGC GTA CAT GTT GCC ATT GTC C
RGR97-K28D.f	GGA CAA TGG CAA CAT GTA CGA CAG CAT CCT GGT GAC C
RGR97-K28D.r	GGT CAC CAG GAT GCT CGT CTA CAT GTT GCC ATT GTC C
RGR97-K44A.f	GGC TGT AAT CCG CGC GGC CAT GGA CAA ACA CAA CC
RGR97-K44A.r	GGT TGT GTT TGT CCA TGG CCG CGC GGA TTA CAG CC
RGR97-K44D.f	GGC TGT AAT CCG CGA CGC CAT GGA CAA ACA CAA CC
RGR97-K44D.r	GGT TGT GTT TGT CCA TGG CGT CGC GGA TTA CAG CC
RGR97-K48A.f	GCA AGG CCA TGG ACG CAC ACA ACC TGG AGG AGG
RGR97-K48A.r	CCT CCT CCA GGT TGT GTG CGT CCA TGG CCT TGC
RGR97-K48D.f	GCA AGG CCA TGG ACG ACC ACA ACC TGG AGG AGG
RGR97-K48D.r	CCT CCT CCA GGT TGT GGT CGT CCA TGG CCT TGC
RGR97-H49A.f	GCA AGG CCA TGG ACA AAG CCA ACC TGG AGG AGG
RGR97-H49A.r	CCT CCT CCA GGT TGG CTT TGT CCA TGG CCT TGC
RGR97-H49D.f	GGC CAT GGA CAA AGA CAA CCT GGA GGA GG
RGR97-H49D.r	CCT CCT CCA GGT TGT CTT TGT CCA TGG CC

Klonierung Rap1A pRSET B, Rap1A G12V pDsRed1-C1 und Rap1A S17N pDsRed1-C1

Bgl2-N-Rap1A	ACT CAG ATC TCG TGA TTA CAA GCT AGT
Rap1A-C-EcoRI	ACT GAA TTC CTA GAG CAG CAG ACA TGA TTT

Klonierung RGR97 pRSET B

Bgl2-N-RalGDS	ACT CAG GAT CTG CGC TGC CGC TCT ACA ACC A
EcoRITGA-RalGDS	ACT GAA TTC TCA GGT CCG CTT CTT CAG GAC

Klonierung RGR-Oligomere in pRSET B

RGR1-fwd	CCG CTC GAG AGC GCT GCC GCT CTA CAA CCA GC
RGR1-revC	CGG GGT ACC AGA TCT GGT CCG CTT CTT CAG GAC
RGR2-fwdB	CGG GGT ACC GCA GCG CTG CCG CTC TAC AAC CAG C
RGR2-revC	CCG GAA TTC TGC ACC GGT CCG CTT CTT CAG GAC
RGR3-fwdB	CCG GAA TTC GGA GCG CTG CCG CTC TAC AAC CAG C
RGR3-revB	CCC AAG CTT TGA TCA GGT CCG CTT CTT CAG GAC

Klonierung Rap1A G12V/D38K pDsRed1-C1

Rap-D38K-fwd	GAC CCA ACG ATA GAA AAG TCC TAC AGA AAG C
Rap-D38K-rev	GCT TTC TGT AGG ACT TTT CTA TCG TTG GGT C

Klonierung Rap1A G12V/C181S pDsRed1-C1

Rap1A-C181S-f	CCT AAA AAG AAA TCA TCT CTG CTG CTC TAG G
Rap1A-C181S-r	CCT AGA GCA GCA GAG ATG ATT TCT TTT TAG G

Klonierung Rap1A S17N pDsRed1-C1 (Klon B)

Rap1AN17.f	CGT TGG GAA GAA TGC TCT GAC AGT TC
Rap1AN17.r	GAA CTG TCA GAG CAT TCT TCC CAA CG

Klonierung Rap2 Konstrukte in pDsRed1-C1

Rap2A-N-BglII	ACT CAG ATC TAT GCG CGA GTA CAA AGT GG
Rap2A-C-EcoRI	ACT GAA TTC CTA TTG TAT GTT ACA TGC
Rap2B-N-BglII	ACT CAG ATC TAT GAG AGA GTA CAA AGT GG
Rap2B-C-EcoRI	ACT GAA TTC TCA GAG GAT CAC GCA GGCs
Rap2A-G12V-f	GGT GGT GCT GGG CTC GGT CGG GGT AGG C
Rap2A-G12V-r	GCC TAC CCC GAC CGA GCC CAG CAC CAC C

Sequenzierungsprimer

T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
pEGFPC1rev	CAT TTT ATG TTT CAG GTT CAG GG

Zur Sequenzierung der pRSETB – Konstrukte wurde der Primer T7, zur Sequenzierung der pEGFP-C2 – und pDsRed1-C1 – Konstrukte der Primer pEGFPC1rev verwendet.

4.1.6 Weitere Materialien

- DMEM (PAA Laboratories)
 - DNase (Sigma)
 - Enterokinase (Novagen)
 - FCS (Biochrom)
 - G418 (PAA Laboratories)
 - γ -[32P]-GTP (Hartmann Analytic GmbH)
 - GSH-Beads (Amersham)
 - IPTG (Appllichem)
 - Kollagen (Sigma)
 - Lipofectamine Reagent (Invitrogen)
 - Lysozym (Sigma)
 - PDGF (Preprotec)
 - Pfu DNA-Polymerase (Fermentas)
 - Polyfect Transfection Reagent (QIAGEN)
 - Restriktionsenzyme (New England Biolabs oder Fermentas)
 - Rotiphorese Gel 30 (Roth) 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid
 - T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)
 - TPA (Alexis Biochemicals)
 - Trypsin / EDTA (PAA Laboratories)
 - Western Lighting Chemoluminescence Reagent (Perkin Elmer Life Science)
-

4.1.7 Puffer und Lösungen

KCM-Transformation

TSB

10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
5 % DMSO
10 % PEG 4000
in LB-Medium

LB-Medium

10 g/l Bactotrypton
10 g/l NaCl
5 g/l Yeast Extrakt

LB-Agar

15 g Agar / 1 l LB-Medium

5x KCM-Puffer

500 mM KCl
150 mM CaCl₂
250 mM MgCl₂

DNA-Gelelektrophorese

50x TAE

2 M Tris-Acetat
50 mM EDTA

6x DNA-Ladepuffer

0,25 % Bromphenolblau
30 % Glycerol

Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

TBN 150

25 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
+ Proteaseinhibitoren
0,1 % Aprotinin (Trasylol)
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Pepstatin A
0,1 µg/ml Pefabloc
1 mM PMSF

EQM + GSH

50 mM Tris-HCl pH 8,0
100 mM NaCl
10 mM DTT (frisch)
10 mM GSH (frisch)

PBS pH 7,5

80 mM Na₂HPO₄
20 mM NaH₂PO₄
100 mM NaCl

Aufreinigung von (His)₆-Fusionsproteinen

Puffer A

25 mM Tris pH 7,5
0,2 M NaCl
5 mM MgCl₂

Dialysepuffer (für RGR, Rap1A und K-Ras)

PBS pH 7,5
5 mM MgCl₂

Puffer B

0,5 M Imidazol in Puffer A

Dialysepuffer (für Rap1GAP)

25 mM NaH₂PO₄ pH 7,0
1 mM DTT
1 mM EDTA

GAP-Assay*Beladungspuffer(Rap)*

25 mM Tris-HCl pH 7,5
 30 mM NaCl
 5 mM EDTA
 2 mg/ml BSA
 0,1 % Triton X-100

Beladungspuffer(Ras)

25 mM HEPES pH 7,5
 50 mM NaCl
 10 mM EDTA
 2 mg/ml BSA
 0,1 % Triton X-100

GAP-Puffer(Rap)

25 mM Tris HCl pH 7,5
 5 mM MgCl₂
 0,1 % NP-40
 1 mg/ml BSA
 400 µM GTP
 1 mM DTT (frisch zugeben)
 0,002 % NaN₃

GAP-Puffer(Ras)

25 mM HEPES pH 7,5
 5 mM MgCl₂
 0,1 % Triton X-100
 1 mg/ml BSA
 400 µM GTP (frisch zugeben)
 1 mM DTT (frisch zugeben)

Die Puffer wurden zweifach konzentriert angefertigt. Zum Ansetzen der jeweiligen Reaktionsansätze wurde der 2x Puffer mit den restlichen Komponenten gemischt und mit Wasser auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt.

GST-RGR Pulldown*Lysispuffer*

50 mM Tris-HCl pH 7,4
 200 mM NaCl
 2,5 mM MgCl₂
 10 % Glycerol
 1 % NP-40

+ Proteaseinhibitoren

0,1 % Aprotinin (Trasylol)
 1 µg/ml Leupeptin
 1 µg/ml Pepstatin A
 0,1 µg/ml Pefabloc
 1 mM PMSF

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot*10 ml Trenngel (15 % Acrylamid)*

Rotiphorese Gel 30	5 ml
2 M Tris-HCl pH 8,8	1,9 ml
Wasser	3,1 ml
20 % SDS	50 µl
20 % Ammoniumpersulfat	60 µl
TEMED	6 µl

Transferpuffer

48 mM Tris
 39 mM Glycin
 0,037 % SDS
 15 % Methanol

10 ml Sammelgel (4 % Acrylamid)

Rotiphorese Gel 30	1,32 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
Wasser	6,2 ml
20 % SDS	50 µl
20 % Ammoniumpersulfat	90 µl
TEMED	5 µl

6x Lämmli-Auflagerpuffer

3 ml 20 % SDS
 3 ml β-Mercaptoethanol
 4 ml Glycerol
 Spatelspitze Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung

2,5 g/l Coomassie R-250
 12,5 % Essigsäure
 37,5 % Ethanol

Elektrophorese-Puffer

250 mM Tris
 2 M Glycin
 35 mM SDS

Entfärber-Lösung

10 % Essigsäure
 45 % Ethanol

TBS-T

10 mM Tris-HCl pH 7,5
 100 mM NaCl
 0,1 % Tween

4.2 Methoden

4.1.2 Arbeiten mit DNA

KCM-Transformation

Herstellung kompetenter Zellen

2 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* XL-1 Blue oder Rosetta (DE3) pLysS angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 150 ml LB-Medium wurden mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen (ca. 3 h). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation mit 6000 rpm pelletiert, in 15 ml TSB resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Transformation

0,1-10 ng der zu transformierenden DNA wurden in 100 µl KCM-Puffer gelöst und auf Eis gekühlt. 100 µl kompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit der DNA-Lösung versetzt. Es wurde für 30 min auf Eis und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C geschüttelt. Je nach erwarteter Transformationseffizienz wurden 50-500 µl der Suspension auf LB-Agar mit Antibiotikum ausgestrichen.

Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli

Plasmid-DNA wurde mit kommerziell erhältlichen Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Verwendet wurden für Präparationen im kleinen Maßstab der *QIAprep Spin Plasmid Kit* (QIAGEN) und für Präparationen im Großmaßstab der *Plasmid Purification Maxi Kit* (QIAGEN) oder *Nucleobond AX* (Machery-Nagel).

Restriktion und Ligation von DNA

Alle Spaltungen von DNA mit kommerziell erhältlich Restriktionsendonucleasen und Ligationen mit T4-Ligase wurden entsprechend den Empfehlungen der Hersteller durchgeführt.

PCR zur Klonierung

Umklonierung von Genen

Für diese Arbeit war es mehrfach erforderlich, Gene von einem Expressionsvektor in einen anderen umzuklonieren. Wenn die in beiden Vektoren vorhandenen Restriktionsstellen es zuließen, konnte dies durch direktes Ausschneiden und Ligation in den neuen Vektor geschehen. Andernfalls wurde die entsprechende Sequenz durch PCR amplifiziert und dabei über die verwendeten Primer zwei die Zielsequenz flankierende Restriktionsstellen eingeführt. Nach anschließender Spaltung des PCR-Produktes wurde dies in den gewünschten Vektor ligiert. Die PCRs wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 2,5 units Pfu-DNA-Polymerase durchgeführt. Die Ansätze enthielten 0,1-0,5 µg Ausgangs-DNA, 1,5 -2 µM je Primer und 4 % DMSO in Pfu-Puffer. Die PCR begann mit 2 min 94 °C, gefolgt von 20-25 Zyklen von 1 min 94 °C, 1 min 50-58 °C (je nach Primerpaar) und 3 min Elongation bei 68 °C. Abgeschlossen wurde die PCR mit 5 min 68 °C. Der Erfolg der PCR wurde in einem 1 %-igem Agarosegel kontrolliert.

Gerichtete Mutagenese – Fusions-PCR

Bei der Fusions-PCR wird mittels mutagener, das heißt nicht vollständig komplementärer, Primer in drei PCR-Schritten gezielt die Gensequenz verändert. Dies wurde zur Klonierung der RGR-Mutanten genutzt (Details siehe 5.1.1). Die ersten beiden PCRs wurden wie im vorherigen Absatz beschrieben durchgeführt. Jeweils 4 % der durch Gelextraktion aufgereinigten PCR-Produkte wurden in einer weiteren Reaktion, zur Fusion beider Produkte, eingesetzt. Diese enthielt bei einem Gesamtvolumen von 50 µl, 2,5 units Pfu-DNA-Polymerase, jeweils 2 µM pRSETB.f und pRSETB.r, 150 nM je dNTP und 4 % DMSO in Pfu-Puffer. Die PCR erfolgte analog dem im vorherigen Absatz beschriebenen Zyklus, mit dem Unterschied, dass die ersten 5 Zyklen mit niedriger *Annealing*-Temperatur (50 °C) und die letzten 25 Zyklen mit hoher *Annealing*-Temperatur (60 °C) durchgeführt wurden. Die so amplifizierte Sequenz enthielt eine BglII- und eine EcoRI-Schnittstelle. Durch entsprechende Spaltung und T4-Ligation wurden die gewünschten Expressionsvektoren erhalten.

Gerichtete Mutagenese – Ein-PCR-Schritt – Mutagenese

Für alle anderen in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mutagenesen wurde eine Methode genutzt, die nur einen PCR-Schritt erfordert, bei dem das gesamte Plasmid amplifiziert wird. Die Mutation wurde über zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer eingeführt. Diese umfassen den zu mutierenden Sequenzabschnitt und enthalten die gewünschten Basenpaarsubstitutionen. Mittels PCR wurde das gesamte Plasmid amplifiziert und anschließend direkt in *E. coli* XL1 Blue transfiziert. Das unveränderte Ausgangsplasmid war

im Reaktionsansatz zwar in nur relativ geringen Mengen enthalten, würde aber, da es methyliert und zirkular ist, wesentlich effizienter transfiziert werden als die PCR-Produkte. Daher wurde das Ausgangsplasmid vor Transfektion mit DpnI verdaut. DpnI spaltet methylierungsabhängig an einer häufig auftretenden Erkennungssequenz (GA_mTC). Die PCR-Ansätze enthielten 2,5 Units Pfu-DNA-Polymerase, 50 ng Ausgangs-DNA, 250 nM je Primer, 200 nM je dNTP und 4 % DMSO in Pfu-Puffer. Folgendes PCR-Protokoll wurde verwendet, 2 min 94 °C, gefolgt von 16 Zyklen á 1 min 94 °C, 1 min 50-58 °C (je nach Primerpaar), 30 min Elongation bei 68 °C und abschließend einmal 40 min 68 °C. Zur Degradation des Ausgangsplasmides wurde der Ansatz nach PCR mit 1 µl DpnI (20 Units) versetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktion

Nach präparativen Restriktionsspaltungen und PCRs ist es in der Regel nötig die gewünschten Produkte von anderen DNA-Fragmenten zu trennen. Dazu wurde das Reaktionsgemisch in einem 1 %-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechende Ethidiumbromid gefärbte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aus diesem Gelstück mittels eines kommerziell erhältlichen Kits die DNA entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert (*Gel Extraction Kit*, QIAGEN). Um DNA ohne Gelelektrophorese direkt aus Reaktionsgemischen zu isolieren, wurde der *PCR Purification Kit* (QIAGEN) verwendet.

4.2.2 Proteinaufreinigung

Proteine wurden entweder als (His)₆- oder GST-Fusionsproteine aus Bakterienlysaten isoliert. Die Verwendung von Affinitäts-Tags ermöglicht die einfache Aufreinigung biochemisch verschiedener Proteine mittels gleicher Standardmethoden.

Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

In Fusion mit GST wurden die katalytische Domäne von NF-1 (NF1-cat) zur Verwendung in GAP-Assays sowie RGR zur Verwendung in GST-RGR Pull Downs aufgereinigt. Die entsprechenden Expressionsvektoren wurden in einem für die Proteinexpression optimiertem *E. coli* Stamm (Rosetta (DE3) pLysS) transformiert. Mit einer 5 ml Übernachtskultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 (ca. 3-4 Stunden) bei 37 °C geschüttelt. Die Proteinexpression erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur nach Induktion mit 100 µM IPTG. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation mit 6000 rpm pelletiert und anschließend in 10 ml TBN 150 mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Durch dreimaliges abwechselndes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen in 37 °C Wasserbad wurden die Zellen lysiert. Nach Zugabe von 0,5 mg/ml

Lysozym wurde das Lysat für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 14 mM EDTA und 0,35 % Triton X-100 versetzt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Bakterienlysat wurde für 30 Minuten mit 20000 rpm bei 4 °C zentrifugiert.

Aus dem Überstand wurde mittels GSH-beads das GST-Fusionsprotein angereichert. Dazu wurde das Lysat mit 1 ml GSH-beads, welche zuvor zweimal mit TBN150 gewaschen wurden, versetzt und 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die GSH-beads wurden viermal mit jeweils 10 ml TBN150 gewaschen, in 10 ml TBN150 resuspendiert und in eine Säule gepackt. Die Elution erfolgte mit 10 mM freiem GSH in 10 ml EQM. Das Eluat wurde zweimal gegen 1 l PBS, 5 mM MgCl₂ dialysiert und anschließend mittels eines Zentrifugationskonzentrators auf etwa 1 ml aufkonzentriert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei -80 °C gelagert und zur Verwendung immer frisch aufgetaut. Die Proteinkonzentration wurde mit der BCA-Methode bestimmt.

Aufreinigung von (His)₆-Fusionsproteinen

Zur Analyse der RGR-Mutanten in GAP-Assays wurden diese als (His)₆-Fusionsproteine hergestellt. Ebenfalls benötigt wurden Rap1GAP, Rap1A und K-Ras. Die entsprechenden Expressionsvektoren wurden in den *E. coli* Stamm Rosetta(DE3)pLysS transformiert. Ausgehend von einer frisch ausplattierten Agarplatte wurden viermal 125 ml LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol, angeimpft. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Kulturen mit 500 µM IPTG induziert und für 4-5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm geerntet und anschließend in 10 ml PBS, 1 % Triton X-100, 5 mM MgCl₂ resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, mit 0,5 mg/ml DNase versetzt und fünfmal für 30 s mittels Ultraschall lysiert. Nach Zentrifugation mit 30000 rpm wurde der Überstand durch einen 0,22 µm Filter filtriert und auf eine 1 ml HiTrap Chelator HP Säule (Pharmacia) geladen. Diese wurde zuvor mit 10 ml 0,3 M NiCl₂ beladen und um überschüssiges Ni²⁺ zu entfernen mit 10 ml Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl gefolgt von 5 ml Puffer B und 10 ml Puffer A gewaschen. Nach der Injektion der Probe auf die Säule wurde diese erst mit 40 ml Puffer A und dann mit 20 ml 20 mM Imidazol in Puffer A (4 % Puffer B) gewaschen. Zur Elution wurde die Imidazol Konzentration in einem kontinuierlichen Gradienten über 30 ml von 20 mM auf 200 mM (40 % Puffer B) erhöht. Das Eluat wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt. Der gesamte Säulenlauf wurde mittels UV-Detektion bei 280 nm überwacht. Zur Wiederherstellung der Säule wurde diese mit 10 ml Puffer B und 20 ml Puffer A gewaschen. 35 µl jeder Fraktion wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und mit einem Zentrifugationskonzentrator auf

etwa 1 ml eingeengt. Nach zweimaliger Dialyse gegen 1 l Dialysepuffer wurde die Proteinlösung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proteine wurden bei -80 °C gelagert und zur Verwendung immer frisch aufgetaut. Mittels BCA-Methode wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

Zur Abspaltung der (His)₆-Markierung wurde vor der Dialyse die Konzentration des Proteins bestimmt. Die Spaltung erfolgte mit 5 Units Enterokinase pro 1 mg Protein in Enterokinase-Puffer bei Raumtemperatur für 16 h. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 mM PMSF. Die abgespaltene (His)₆-Markierung wurde durch erneute (His)₆-Affinitätschromatographie entfernt. Dazu wurden Einwegsäulen mit 0,5 ml Ni-NTA-Beads bepackt und mit 5 ml Puffer A equilibriert. Der Spaltungsansatz wurde aufgetragen und anschließend die Säule mit 4 ml Puffer A gewaschen. Der gesammelte Durchlauf enthält (His)₆-freies Protein, welches wie oben beschrieben konzentriert und dialysiert wurde.

Bestimmung der Proteinkonzentration - BCA-Methode

Bei der BCA-Methode kommt es zur Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch die Peptidbindungen und einige Aminosäuren (Cystein, Tyrosin und Tryptophan). Die Cu⁺-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen farbigen Komplex, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann (Lottspeich, 1998). Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers mit einem kommerziell erhältlichen Kit durchgeführt (*Micro BCA Protein Assay Reagent Kit*, PIERCE).

4.2.3 GAP-Assay

Der GAP-Assay bietet eine relativ schnelle Möglichkeit zur Abschätzung der Affinität von Bindungspartnern kleiner GTPasen. Der Bindungspartner kompetitiert mit einem Guaninnukleotid-Austausch-Protein (GAP) um die Bindung an die γ -[³²P]-GTP – beladene GTPase und verzögert somit die GTP-Hydrolyse, die als Freisetzung des radioaktiv markierten γ -Phosphats gemessen wird.

Zur Beladung von Rap1A mit γ -[³²P]-GTP, wurden 17 μ M Rap1A zusammen mit 0,5 nM γ -[³²P]-GTP (6 Ci/ μ mol) in Beladungspuffer für 5 min bei 37 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen des Beladungsansatzes richtet sich nach der Zahl der geplanten Messreihen (10 μ l pro Messreihe). EDTA im Beladungspuffer komplexiert Mg²⁺-Ionen, ohne die Guaninnukleotide nicht an Rap1A binden können. Rap1A ist also nukleotidfrei. Nach Zugabe von 15 mM MgCl₂ bindet Rap1A wieder Guaninnukleotide und dabei auch γ -[³²P]-GTP. Der Beladungsansatz wird bei 4 °C gehalten und so schnell wie möglich verwendet, um Fehler durch die intrinsische GTPase-Aktivität von Rap zu vermeiden. Pro Messreihe wurden 10 μ l des Beladungsansatzes mit der zu untersuchenden RGR in GAP-Puffer (Gesamtvolumen 220 μ l) für 5 min auf Eis gefolgt von 1 min bei 30 °C vorinkubiert. Eine Messreihe wurde zur

Kontrolle in Abwesenheit von RGR durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl RapGAP gestartet und bei 30 °C gehalten. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 20 µl entnommen und zu 480 µl 5 % Aktivkohle in 8,6 mM H₃PO₄ gegeben, dabei wurde die Hydrolyse abgestoppt. Guaninnukleotide absorbieren an die Aktivkohle während freies [³²P]-Phosphat im Überstand verbleibt. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 15 min, 4 °C) wurden 200 µl des Überstandes im Szintillationscounter nach der Cerenkov-Methode vermessen.

Für die Untersuchung der Bindung an Ras wurde der GAP-Assay mit K-Ras und NF-1-cat unter Verwendung für Ras-optimierter Beladungs- und GAP-Puffer durchgeführt. Die jeweils verwendeten Konzentrationen an GAPs und an Rap bzw. Ras sind in bei den entsprechenden Abbildungen angegeben.

4.2.4 Zellkultur

Cos-7 und stabil transfizierte PAE Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Erhalt der stabilen Transfektion der PAE Zellen wurde dem Medium 600 µg/ml G418 zugesetzt. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert. Dazu und zum Aussäen der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml Trypsin / EDTA gespült und dann mit 1 ml Trypsin / EDTA versetzt. Nach 1-2 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen vom Boden der Flasche abgeschlagen. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 9 ml DMEM 10 % FCS gestoppt. 0,5 - 2 ml der so erhaltenen Zell suspension wurden in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit DMEM 10 % FCS auf 15 ml aufgefüllt. Für Experimente wurde die Zellzahl durch Zählen in der Neubauerkammer bestimmt und die erforderliche Anzahl an Zellen ausgesät.

Transfektion

Polyfect

Polyfect (QIAGEN) ist ein aktiviertes Dendrimer, welches mit DNA kompakte Strukturen bildet, die von den Zellen aufgenommen werden können. Die Bindung an die Zelloberfläche wird durch die positive Nettoladung des DNA-Polyfect-Komplexes ermöglicht. Außerdem verhindert Polyfect die Degradation der DNA durch lysosomale Nucleasen.

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen in 35 mm Zellkulturschalen oder 6-Lochplatten ausgesät. Direkt vor der Transfektion wurde das Medium gegen 1,5 ml frisches DMEM 10 % FCS ausgetauscht. In 100 µl DMEM ohne FCS wurden 1,5 µg DNA gelöst und zu dieser Lösung 10 µl Polyfect gegeben. Für Doppeltransfektionen wurden von jedem Plasmid 1,5 µg und bei Dreifachtransfektion 1 µg je Plasmid eingesetzt. In beiden Fällen wurden 20 µl Polyfect verwendet. Die DNA-Polyfect-Mischung wurde für 5-10 min bei

Raumtemperatur stehengelassen, anschließend mit 600 µl DMEM 10 % FCS gemischt und sofort auf die Zellen gegeben. Nach 24-48 h wurden die Zellen analysiert.

Lipofectamine

Lipofectamine ist eine 3:1 Liposomen-Mischung aus dem polykationischem Lipid DOSPA und dem neutralen Lipid DOPE. Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen in 35 mm Zellkulturschalen bzw. 6-Lochplatten ausgesät. 1 µg DNA je Plasmid wurde in 100 µl DMEM gelöst. Separat wurden 10 µl Lipofectamine mit 90 µl DMEM gemischt. Beide Lösungen wurden vereinigt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen mit 2 ml DMEM ohne FCS gewaschen und anschließend mit 500 µl DMEM versetzt. Die DNA-Lipofectamine-Lösung wurde mit 300 µl DMEM gemischt und sofort auf die Zellen gegeben. Nach drei Stunden wurde die Transfektionslösung gegen 2 ml DMEM 10 % FCS ausgetauscht, dabei wurden die Zellen einmal mit DMEM 10 % FCS gewaschen. Nach 24-48 h wurden die Zellen analysiert.

4.2.5 GST-RGR Pull Down

Der GST-RGR Pull Down dient zur Isolation von aktivem Rap aus Zelllysaten. Dabei wird Rap-GTP an GST-RGR gebunden und dieser Komplex anschließend durch Bindung an GSH-beads und Zentrifugation vom restlichen Zelllysate getrennt. Die Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät, wenn erforderlich transfiziert und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Die Lyse erfolgte in 1 ml eiskaltem Lysispuffer in Gegenwart von 20 µg/ml GST-RGR. Das Lysat wurde für 15 min bei 4 °C und 20000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 40 µl GSH-beads, die vorher dreimal mit Lysispuffer gewaschen worden, versetzt und für 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert und 40 µl des Überstandes als Zelllysate zur Analyse abgenommen und mit 8 µl 6x Lämmli-Ladepuffer versetzt. Die Beads wurden zweimal mit Lysispuffer gewaschen und daraufhin in 40 µl 2x Lämmli-Ladepuffer aufgenommen.

4.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Die jeweils verwendeten Polyacrylamidkonzentrationen sind bei den gezeigten Abbildungen angegeben. Für Western Blots wurden PVDF-Membranen verwendet. Es wurde mit 1,5 % BSA in TBS-T geblockt und nach Inkubation mit Antikörpern mindestens dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Zur Entwicklung der Blots wurden HRP (horse radish peroxidase) – gekoppelte sekundäre Antikörper und Western Lighting Chemoluminescence Reagent verwendet.

Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung dient zum Anfärben von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen. Die Proteingele werden für mindestens 15-30 min in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Das Gel wurde mehrmals mit Entfärberlösung und zum Schluss mit Wasser (vermindert Einreißen bei der Trocknung) gewaschen, bis das Gel ausreichend entfärbt und die Banden gut sichtbar waren. Coomassie-gefärbte Gele wurden zur Aufbewahrung vakuumgetrocknet.

4.2.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) können fluoreszierende Moleküle innerhalb eines optischen Schnittes von etwa 1 µm Dicke beobachtet werden. Die Messungen wurden an drei verschiedenen Mikroskopen durchgeführt, ein Zeiss LSM 510 / Axiovert 100 – Setup (bereitgestellt von Prof. S. Heinemann, AG Molekulare und zelluläre Biophysik, FSU Jena), ein Zeiss LSM5 Pascal / Axiovert 200M – Setup (bereitgestellt von Dr. J. Lindenau, AIM, Carl-Zeiss Jena) und ein Zeiss Confocor2 / Axiovert 200M – Setup (bereitgestellt von Dr. P. Hemmerich, IMB Jena). An den ersten Beiden erfolgten die Messungen in speziellen 35 mm Glasboden-Zellkulturschalen bei Raumtemperatur unter Verwendung eines *C-Apochromat 63x/1.2 Wasser corr* Objektives. Letzteres Setup ist mit einem Heiztisch (Zeiss Tempcontrol, 37-2 digital) ausgestattet, so dass die Zellen während der Messung bei 37 °C gehalten werden konnten. Dazu war es erforderlich die Zellen auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 42 mm zu kultivieren. Beobachtet wurden die Zellen hier durch ein *Plan-Apochromat 63x/1.4 Öl DIC* Objektiv. Die Ergebnisse der Messungen bei 37 °C unterschieden sich nicht von denen bei Raumtemperatur.

Sowohl die Glasboden-Zellkulturschalen als auch die Deckgläschen wurden zur Beschichtung mindestens 30 Minuten mit 50 µg/ml Kollagen in PBS bei 37 °C behandelt und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Einen Tag vor der Transfektion wurden $0,5-1,5 \times 10^5$ Zellen pro Glasboden-Zellkulturschale bzw. $1-3 \times 10^5$ Zellen pro Deckgläschen (in 60 mm Zellkulturschale) in DMEM 10 % FCS eingesät. 24 h nach Transfektion wurde das Medium gegen DMEM 0,25 % FCS ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 h gehungert. Mindestens eine Stunde vor der Messung wurden die Zellen mit frischem DMEM 0,25 % FCS, welches zusätzlich 25 mM HEPES gepuffert war, versetzt.

Tabelle 4.1 zeigt für DsRed1, GFP und CFP, welcher Laser zur Anregung genutzt und in welchen Wellenlängenbereich das emmitierte Licht gemessen wurde. Für Kolokalisationsstudien wurde der Mehrkanalmodus verwendet. Das heißt, die Detektion der verschiedenen Proteine geschah nacheinander. Dabei liegen die beiden Aufnahmen in etwa 15 Sekunden auseinander, dies ist die Zeit, die ein Scan typischerweise benötigt. Das kann

vor allem bei der Beobachtung von sehr beweglichen Vesikeln dazu führen, dass die beiden Signale nicht vollständig überlappen. Der Pinhole-Durchmesser wurde so gewählt, dass optische Schnitte von 1 μm Dicke erhalten wurden.

Vor Stimulation der Zellen durch Zugabe von 1 μM TPA bzw. 50 ng/ml PDGF wurden diese für mindestens fünf Minuten beobachtet. Die Zellen wurden in 30 s Intervallen aufgenommen und nach Stimulation für mindestens 20 min verfolgt.

	Laser	Anregungs- wellenlänge	Filter	Detektierte Emission
DsRed1	Argon	543 nm	Langpass	> 560 nm
EGFP	Helium-Neon	488 nm	Bandpass	505-550 nm
ECFP	Helium-Neon	458 nm	Metadetektor	467-488 nm

Tab. 4.1 Verwendete Bedingungen zur Anregung und Detektion von fluoreszierenden Proteine im LSM

5. Ergebnisse

5.1 Veränderte Bindungseigenschaften durch RGR – Mutation

Ziel der vorliegenden Arbeit war es oligomere Sonden zu entwickeln, die es erlauben, die Aktivierung von Rap in lebenden Zellen zu beobachten. Als selektive Sonde für die aktive GTP-beladene Form von Rap diente die Rap/Ras-Bindedomäne von RalGDS (RalGDS-RBD oder RGR). Um eine Sonde zu erhalten, die in der Zelle effizient und mit hoher Spezifität zu Rap-GTP transloziert und gleichzeitig das endogene Rap-Signaling möglichst wenig blockiert, war es nötig RGR-Mutanten mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften zu testen.

Aufgrund sehr ähnlicher Effektorbindungsstellen binden Ras und Rap1 an gleiche Effektoren, wenn auch mit unterschiedlichen Affinitäten. Die RalGDS-RBD bindet bevorzugt Rap während die Raf-RBD stärker an Ras assoziiert. Basierend auf den Strukturdaten des Komplexes aus Rap1 (aa 1-167) und der Raf-RBD (aa 51-131 in c-Raf-1) sowie des Komplexes aus Ras und der RalGDS-RBD (aa 11-97 in RalGDS) wurden fünf Aminosäuren der RalGDS-RBD, die potentiell an der Bindung zu Rap beteiligt sind, zur Mutation ausgewählt (Geyer, 1997; Nassar, 1995). Arginin16, Lysin28, Lysin48 und Histidin 49 befinden sich in der Tertiärstruktur von RalGDS-RBD an ähnlichen Positionen wie Aminosäuren der Raf1-RBD, die an der Bindung zu Rap1 beteiligt sind. Lysin44 der RalGDS-RBD zeigt ein verändertes NMR-Signal nach Bindung von Ras. RalGDS-RBD – Mutanten mit Alanin- und Aspartat- Substitutionen dieser fünf positiv geladenen Aminosäuren wurden kloniert und aufgereinigt.

5.1.1 Klonierung

Um die RGR-Mutanten später als (His)₆-Fusionsproteine aufzureinigen zu können, wurde zuerst die RGR-Wildtypsequenz, bestehend aus den ersten 97 N-terminalen Aminosäuren von RalGDS, in pRSET B umklont. Als Ausgangsplasmid hierfür diente GST-RalGDS pGEX-4T3. Mittels der beiden Primer Bgl2-N-RalGDS und EcoRITGA-RalGDS wurde die gewünschte Sequenz flankiert von einer BglII- und einer EcoRI- Schnittstelle amplifiziert. Nach BglII / EcoRI – Restriktion wurde das Insert in ebenfalls BglII / EcoRI geschnittenen pRSET B ligiert. Das daraus resultierende Plasmid diente als Ausgangspunkt für die gezielte Mutagenese der zuvor ausgewählten Aminosäuren. Für alle Mutationen wurden jeweils zwei zu einander komplementäre Mutationsprimer RGR97-xxx.f und RGR97-xxx.r (xxx – je nach Aminosäuresubstitution) konstruiert. Diese umfassen den zu mutierenden Abschnitt und enthalten die gewünschten Mutationen, sind also nur teilweise komplementär zur Wildtyp-Sequenz. In zwei Mutations-PCRs wurde jeweils die stromaufwärts der Mutation und die

stromabwärts der Mutation gelegene Sequenz amplifiziert. Dazu wurden die beiden Primerpaare pRSETB.f / RGR97-xxx.r und RGR97-xxx.f / pRSETB.r verwendet. Beiden PCR-Produkten ist die Sequenz der Mutationsprimer gemein. Über diese wurden Beide in einer weiteren PCR mit pRSETB.f und pRSETB.r als Primer fusioniert. Das Fusionsprodukt enthielt die gewünschte Mutation und wurde nach BglII / EcoRI-Spaltung in entsprechend geöffneten pRSET B ligiert. Der Erfolg der Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt.

5.1.2 Aufreinigung

Die (His)₆-markierten RGR-Mutanten wurden in *E. coli* (Rosetta (DE3) pLysS) exprimiert und aus dem Bakterienlysats mittels (His)₆-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb. 5.1 C). Eine Enterokinase-Schnittstelle zwischen der (His)₆-Markierung und der RGR-Sequenz ermöglichte die Abspaltung der (His)₆-Markierung. Dies erforderte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 16 Stunden, was gelegentlich zum Ausfallen des Proteins führte. Da erste GAP-Assays zeigten, dass die (His)₆-Markierung keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Bindedomänen hat, wurde bei späteren Aufreinigungen auf die Abspaltung der (His)₆-Markierung verzichtet.

5.1.3 Effekt der Mutationen auf die Rap-Bindung – GAP-Assay

Um zu testen, welchen Einfluss die einzelnen Mutationen auf die Affinität zu Rap haben, wurden die Bindedomänen in einem GAP-Assay miteinander verglichen. Dieser liefert zwar nur qualitative Aussagen im direkten Vergleich innerhalb eines Versuches, hat aber den Vorteil, dass mit relativ geringem Aufwand in kurzer Zeit die Affinitäten der RGR-Mutanten zu Rap abgeschätzt werden können. Als Maß für die Stärke der Bindung dient die Fähigkeit der Bindedomänen durch Assoziation an mit γ -[³²P]-GTP – beladenem Rap die Bindung von Rap1GAP zu stören und so die Rap1GAP stimulierte GTP-Hydrolyse zu verzögern. Bei jedem Versuch wurde eine Kontrolle ohne Bindedomäne durchgeführt, welche die γ -[³²P]-Freisetzung bei unbeeinflusster Hydrolyse zeigt. Wie stark eine Bindedomäne diese Hydrolysegeschwindigkeit senken kann, hängt von dem Verhältnis an eingesetztem Rap1GAP zu eingesetzter Bindedomäne ab. Da die getesteten RGR-Mutanten einen relativ weiten Affinitätsbereich abdecken, war es nicht möglich alle Mutanten in einem Assay zu testen. Anstelle dessen wurden die Bindedomänen bei drei verschiedenen Rap1GAP / RGR-Verhältnissen getestet (Abb. 5.2). Die Konzentration an Rap1A wurde in allen Versuchen konstant gehalten (770 nM). Abbildung 5.2 A zeigt einen GAP-Assay bei dem ein hohes Rap1GAP / RGR – Verhältnis gewählt wurde. Dies ist ersichtlich an der schnellen Hydrolyse der Kontrolle ohne Bindedomäne. Innerhalb einer Minute ist das gesamte Rap gebundene γ -[³²P]-GTP hydrolysiert. In Gegenwart von RGR-WT ist die Hydrolyse stark verlangsamt. Dies gilt auch für RGR-K48A, demnach hat die Mutation von

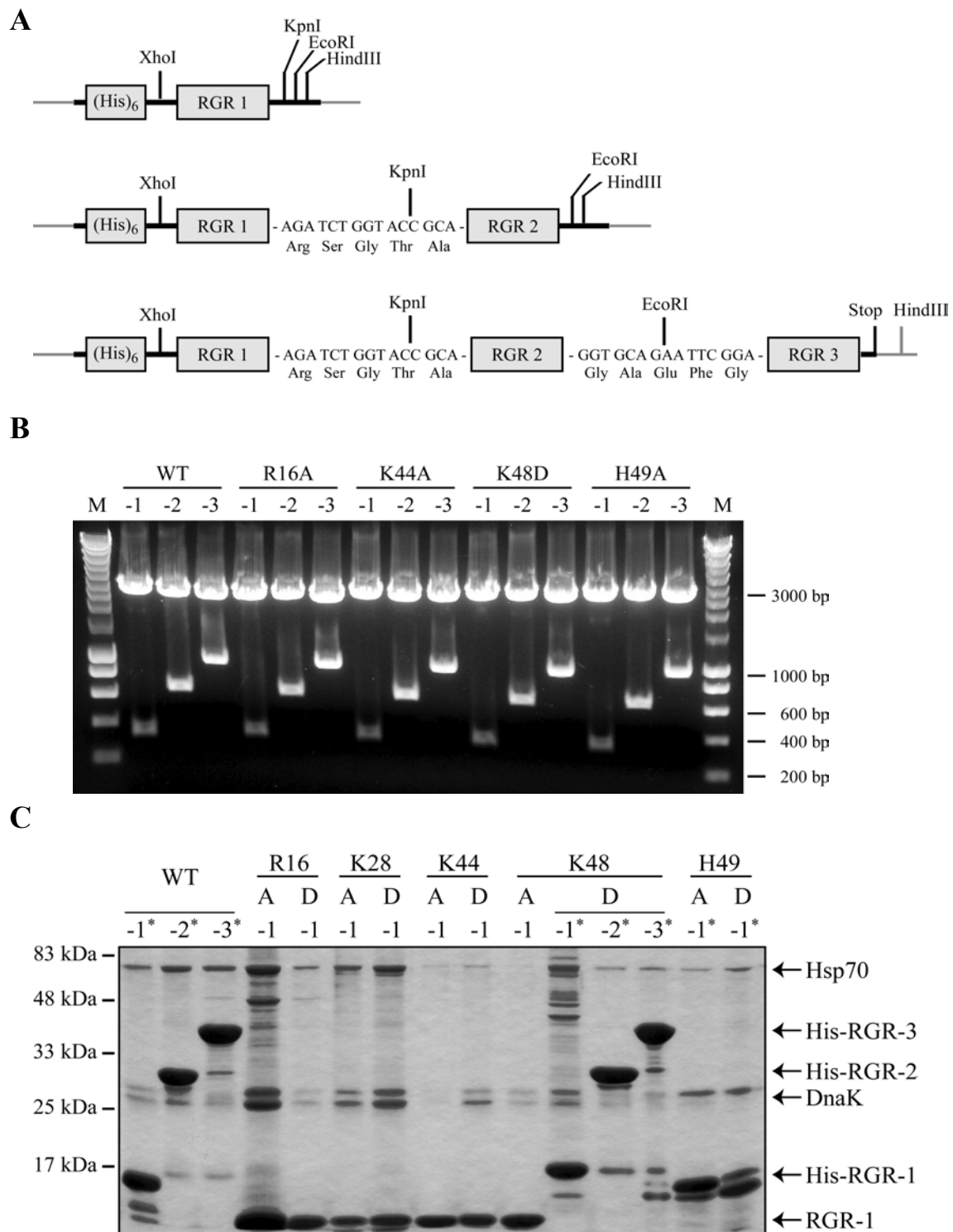


Abb. 5.1 Klonierung und Aufreinigung der RGR-Oligomere

(A) Schematische Darstellung der RGR-Oligomere. Sequenz der Linker und für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

(B) XhoI / HindIII – Restriktion der RGR-Oligomere in pRSET B

(C) Coomassie-Gel der aufgereinigten RGR-Monomere sowie der Di- und Trimer von RGR-WT und RGR-K48D-3. Die mit „*“ gekennzeichneten Proteine enthalten die (His)₆ – Markierung. Bei allen anderen wurde dieser mittels Enterokinase abgespalten. Alle Präparationen enthalten in unterschiedlichen Anteilen koaufgereinigte *E.coli* Chaperone (DnaK und Hsp70).

Lysin 48 zu Alanin keinen erkennbaren Einfluss auf die Bindung an Rap1A. Anders die K44A Mutation diese hat einen deutlichen, wenn auch verglichen mit den restlichen Mutanten nur schwachen, Effekt auf die Rap-Bindung. Testet man dieselbe Bindedomäne in Anwesenheit von weniger Rap1GAP bei gleichzeitiger Erhöhung der RGR-Konzentration ist RGR-K44A in der Lage die Geschwindigkeit der Hydrolyse noch stärker zu senken (Abb. 5.2 B). Einen unter diesen Bedingungen relativ schwachen Effekt hat die Raf-RBD. Die Bindungsstärke der Mutanten RGR-R16A, RGR-R16D und RGR-K44D liegt zwischen denen von RGR-K44A und Raf-RBD. Der K_D -Wert für die Bindung von Raf-RBD an Rap ist bekannt und beträgt 1,2 μM (Nassar, 1996). Dies erlaubt es abzuschätzen wie stark abgeschwächt die Rap-Affinität der einzelnen Mutanten ist. Die Wildtyp Bindedomäne RGR-WT bindet an Rap mit einem K_D -Wert von 0,01 μM (Nassar, 1996). Eine verglichen mit Raf-RBD leicht verringerte Rap-Bindung ist für RGR-H49A zu beobachten (Abb. 5.2 C). Die Mutationen K48D und H49D resultieren in einer nochmals deutlichen Abschwächung der Rap-Bindung. Die Substitution von Lysin28 sowohl zu Alanin als auch zu Aspartat führt zum Verlust der Fähigkeit zur Bindung an Rap. Freilich ist nicht völlig auszuschließen, dass die Bindung von RGR-K28A und RGR-K28D zwar möglich, aber im GAP-Assay nicht eindeutig nachzuweisen ist. Der Vergleich von Abb. 5.2 B und C macht deutlich, wie wichtig ein optimales Rap1GAP / RGR- Verhältnis ist, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Bindedomänen im GAP-Assay sichtbar zu machen. In Abb. 5.2 C liegen zwischen der Kontrolle und dem Verlauf der Hydrolyse in Gegenwart von Raf-RBD die Kurven der fünf restlichen Bindedomänen. Bedenkt man den relativ geringen Unterschied zwischen der Kontrolle und Raf-RBD in Abb. 5.2 B, wäre es unter diesen Bedingungen nicht möglich gewesen, z.B. zwischen der nichtbindenden RGR-K28D und der sehr schwach bindenden RGR-K48D zu unterscheiden. Sehr gut mit den Erwartungen übereinstimmend ist die Beobachtung, dass die Substitution durch Alanin einen geringeren Effekt auf die Assoziation an Rap hat als die Substitution durch negativ geladenes Aspartat. Ausnahme hierbei ist Lysin28, bei dem die Alaninsubstitution ausreichend für den vollständigen Verlust der Rap-Bindung ausreichend ist.

Neben der Wildtyp Bindedomäne wurden für die weiteren Arbeiten RGR-K44A mit leicht abgeschwächter, RGR-R16A mit moderat abgeschwächter und die Mutanten RGR-K49A und RGR-K48D mit stark abgeschwächter Rap-Bindung verwendet. Diese Auswahl an unterschiedlichen RGR-Modulen sollte es möglich machen, eine Sonde zu konstruieren, die unter *in vivo* Bedingungen eine Detektion von Rap-GTP gestattet.

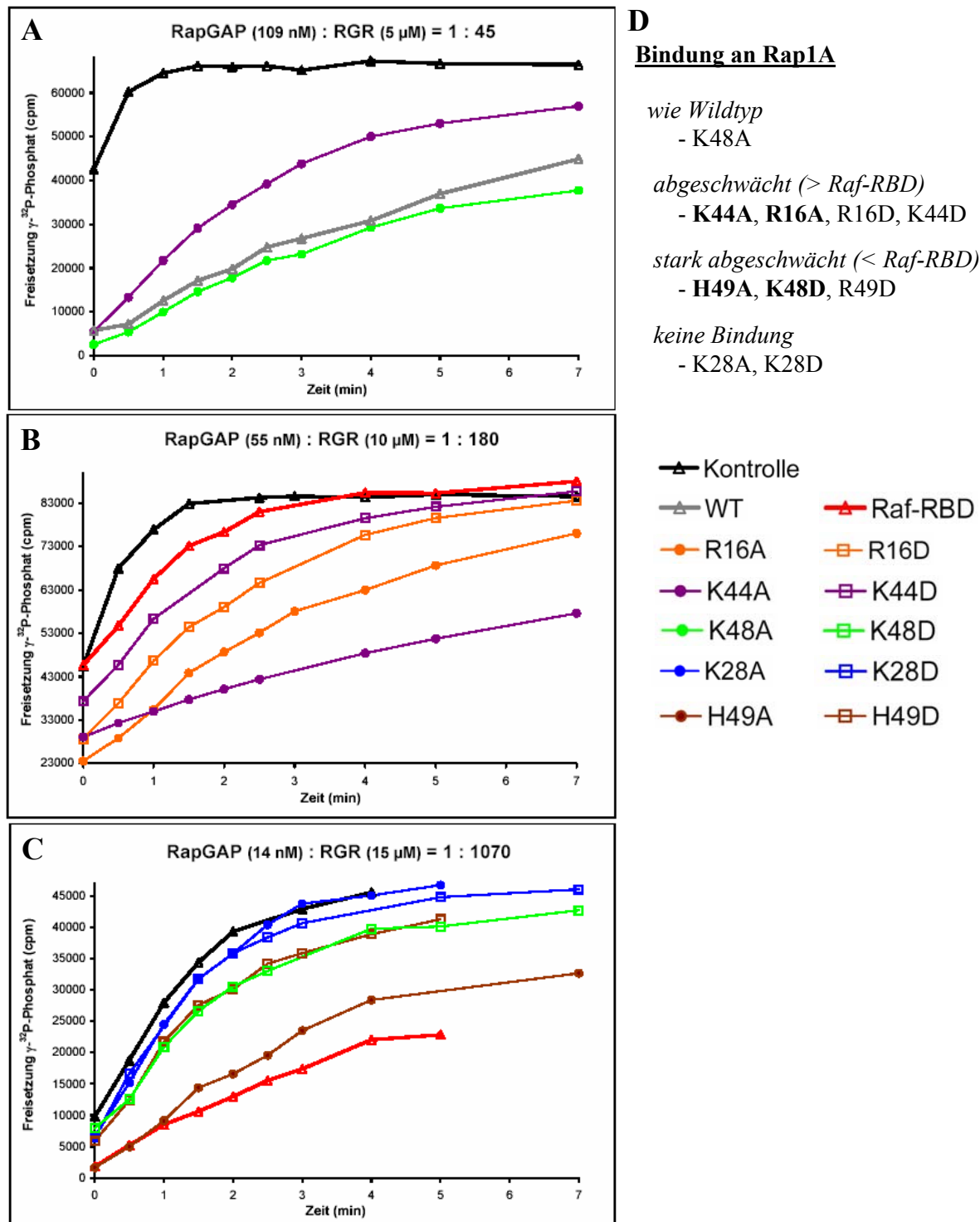


Abb. 5.2 RGR-Mutanten mit unterschiedlich stark abgeschwächter Rap1-Bindung

(A), (B), (C) GAP-Assay. Die jeweiligen molaren Verhältnisse von Rap1GAP zu RGR sind angegeben. Die Rap1 – Konzentration wurde mit 770 nM konstant gehalten. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei voneinander unabhängige Experimente.

(D) Einteilung der RGR-Mutanten nach ihrer Affinität zu Rap1 im Vergleich zu RGR-WT ($K_D = 0,01 \mu\text{M}$) und Raf-RBD ($K_D = 1,2 \mu\text{M}$)

5.2 Veränderte Bindungseigenschaften durch RGR-Oligomerisierung

Um eine gut detektierbare Translokation der Rap-GTP-Sonde zu Stellen der Rap-Aktivierung zu erreichen, ist es entscheidend, dass die Sonde möglichst lange an der Membran verweilt. Dies sollte durch Di- und Trimerisierung der Bindedomänen erreicht werden. Das Anbieten mehrerer Bindestellen auf einem Molekül lässt erwarten, dass die Dauer der Assoziation an Rap-GTP erhöht wird. Um den experimentellen Aufwand in Grenzen zu halten wurden nur die Wildtyp Sequenz und vier ausgewählte Mutanten, die einen weiten Bereich unterschiedlicher Affinitäten zu Rap abdecken, oligomerisiert (siehe 5.1.3).

5.2.1 Klonierung

Zur Klonierung dieser Oligomere war es nötig, die zuvor klonierten RGR-Konstrukte erneut in pRSET B zu klonieren, diesmal allerdings unter Verwendung anderer Restriktionschnittstellen. Ausgehend von den bereits vorhandenen RGR-Plasmiden wurde jede der verschiedenen RGR-Sequenzen mit drei unterschiedlichen Primerpaaren amplifiziert. Die Primerpaare wurden so konstruiert, dass die resultierenden PCR-Produkte jeweils von unterschiedlichen Restriktionsstellen flankiert sind. Durch sequenzielle Ligation in pRSET B wurden nacheinander Mono-, Di- und Trimere der RGR-Varianten kloniert. Dabei sind die einzelnen RGR Module durch einen Linker aus 15 Basenpaaren von einander getrennt (Abb. 5.1 A und B). Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt.

5.2.2 Effekt der Oligomerisierung auf die Rap-Bindung – GAP-Assay

Die RGR-Oligomerisierung lässt eine verstärkte Bindung an Rap-GTP erwarten. Um dies zu bestätigen, wurden Mono- Di- und Trimer von RGR-WT im GAP-Assay verglichen (Abb. 5.3 A). Die Konzentration der Oligomere wurde so gewählt, dass jeweils gleiche Konzentrationen an Rap-Bindestellen vorhanden waren. Der Einfluss auf die GTP-Hydrolyse ist in allen drei Fällen gleich. Demnach macht es keinen Unterschied, ob drei Bindedomänen einzeln oder fusioniert als Trimer vorliegen. Dies spricht auch dafür, dass sowohl im Dimer als auch im Trimer alle Bindestellen für eine Bindung an Rap zur Verfügung stehen. Das Ausbleiben einer verstärkten Bindung durch die Oligomerisierung, entspricht nicht den Erwartungen. Ein derartiger Effekt wurde für Oligomere der Raf-RBD und deren Bindung an Ras beobachtet. Dieser tritt auch auf wenn man die Bindung der Raf-RBD-Oligomere an Rap betrachtet. Im Gegensatz dazu zeigen die RGR-Oligomere auch in ihrer Bindung an Ras keinen Unterschied zueinander (Abb. 5.3 A). Die Natur der Bindung von RGR an Ras bzw. Rap unterscheidet sich von der Natur der Raf-RBD Bindung. Während Erstere hauptsächlich Enthalpie getrieben ist, zeichnet sich Zweitere durch einen

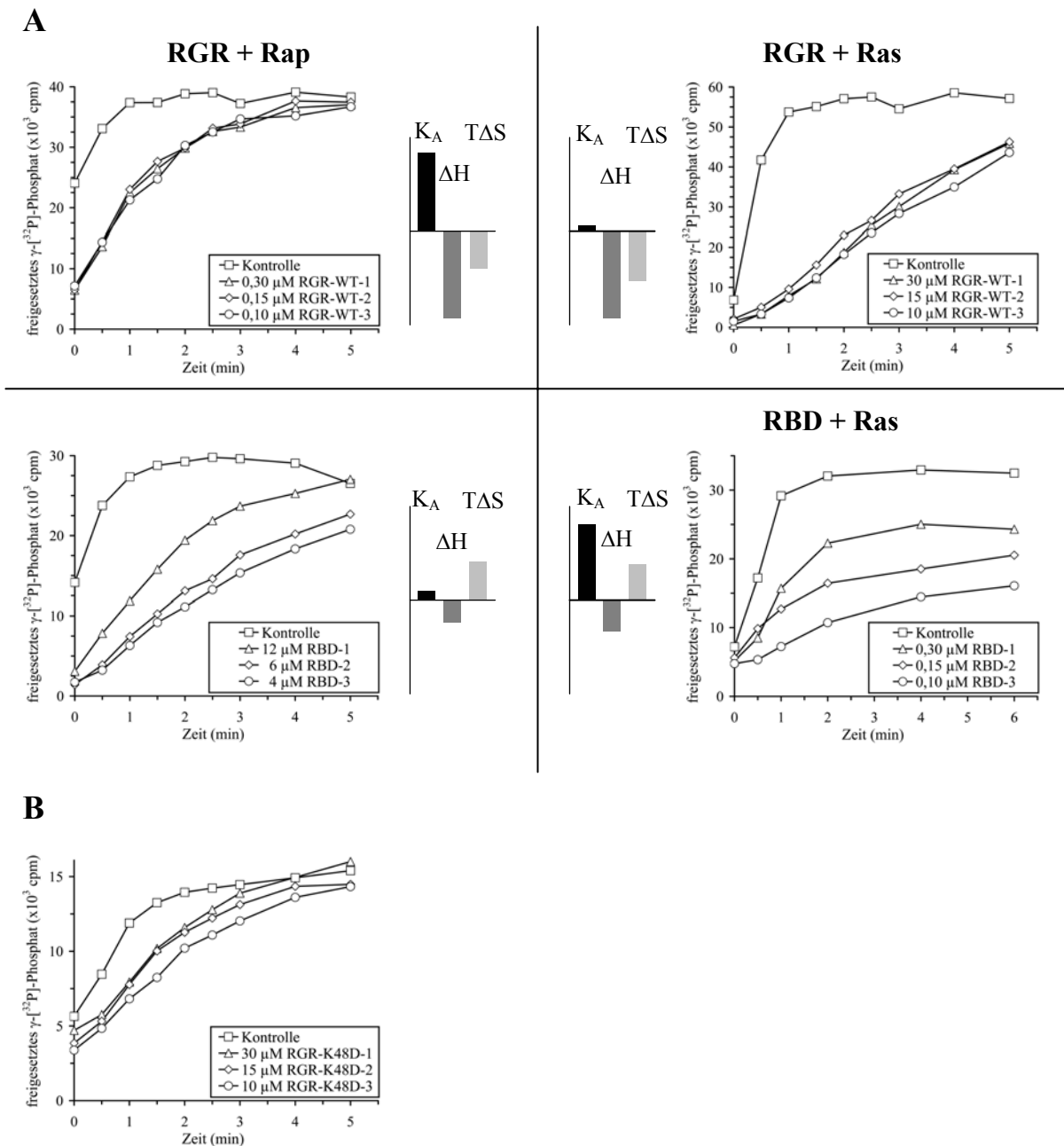


Abb. 5.3 Auswirkung der Oligomerisierung von RGR-WT und RBD auf die Rap / Ras - Bindung

Vergleich der Mono-, Di-, und Trimere im GAP-Assays mit jeweils gleicher Konzentration an Bindestellen.

(A) Folgenden Konzentration an K-Ras / Rap1 und GAPs wurden verwendet: RGR+Rap (110 nM Rap1GAP, 50 nM Rap1), RBD+Rap (80 nM Rap1GAP, 300 nM Rap1), RGR+Ras (37,5 $\mu\text{g/ml}$ NF-1-cat, 50 nM K-Ras) und RBD+Ras (50 $\mu\text{g/ml}$ NF-1-cat, 80 nM K-Ras). Balkendiagramme zeigen die thermodynamischen Parameter (K_A , ΔH und $T\Delta S$) der jeweiligen Bindung (Herrmann, 2003).

(B) Folgende Konzentrationen an Rap1 und Rap1GAP wurden verwendet: 420 nM Rap1 und 27 nM Rap1GAP.

hohen Entropieanteil aus (Herrmann, 2003 und Abb. 5.3 A). Dies könnte Ursache für das unterschiedliche Verhalten der Raf-RBD- und RGR-Oligomere sein. Andererseits ist es auch denkbar, dass ein potentiell vorhandener Einfluss der Oligomerisierung auf die Rap-Bindung unter den im GAP-Assay verwendeten Bedingungen nicht deutlich wird. In diese Richtung deutet, dass die in ihrer Rap-Bindung stark abgeschwächte RGR-K48D-3 eine leichte Zunahme der Rap-Bindung mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad der Bindedomäne zeigt (Abb. 5.3 B). Allerdings sind die Unterschiede zwischen den Oligomeren für einen GAP-Assay zu gering, um anhand dessen eine wirkliche sichere Aussage zu treffen.

5.3 Klonierung fluoreszenzmarkierter RGRs und Rap-Varianten

5.3.1 GFP-markierte RGR-Oligomere

Zur Detektion in der lebenden Zelle mussten die RGR-Oligomere mit einem fluoreszierenden Marker versehen werden. Daher wurden diese N-terminal mit EGFP fusioniert. Die RGR-Sequenzen wurden mit XhoI und HindIII aus den entsprechenden pRSET B Konstrukten ausgeschnitten und in den ebenfalls XhoI / HindIII – geschnittenen Expressionsvektor pEGFP.C2 ligiert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt.

5.3.2 DsRed1-markierte Rap-Isoformen und deren Mutanten

Zur Klärung der Frage inwieweit die konstruierten EGFP-RGR-Konstrukte als Rap-GTP-Sonden geeignet sind, war es nötig deren zelluläre Verteilung in Gegenwart verschiedener Rap-Isoformen und Rap-Mutanten zu analysieren. Um die Lokalisation der Rap-Varianten ebenfalls durch Fluoreszenzmikroskopie verfolgen zu können, wurden diese mit einem DsRed1-Marker versehen. DsRed1 lässt sich im Fluoreszenzmikroskop gut neben EGFP detektieren, da die Anregungs- und Emissionsspektren beider ausreichend weit auseinander liegen. Da die C-terminale posttranslationale Modifizierung von Rap essentiell für die Verankerung in der Membran ist, wurde DsRed1 an den N-Terminus der Bindedomänen fusioniert. Die Klonierung der entsprechenden Konstrukte ist im Folgenden kurz beschrieben. Die Rap1A-WT Sequenz wurde durch BglII / EcoRI – Restriktion aus Rap1A pRSET B gewonnen und in den entsprechend geöffneten Vektor pDsRed1-C1 ligiert.

Die Rap1A-G12V Sequenz wurde durch PCR mit Rap1A-G12V pRK5 als Matrize und Bgl2-N-Rap1A und Rap1A-C-EcoRI als Primern gewonnen. Die so eingeführten BglII und EcoRI Schnittstellen wurden anschließend zur Ligation in pDsRed1-C1 genutzt.

Rap1A-G12V / D38K und Rap1A-G12V / C181S wurden durch gezielte Mutagenese von Rap1A-G12V pDsRed1-C1 erhalten. Unter Verwendung der Primerpaare Rap-D38K-fwd / Rap-D38K-rev bzw. Rap1A-C181-f / Rap1A-C181-r wurden die Mutationen durch Ein-PCR-Schritt-Mutagenese eingeführt.

Rap1A-S17N (Klon A) wurde analog zu Rap1A-G12V kloniert. Aufgrund von Problemen bei der Expression von dsRed1-Rap1A-S17N wurde dieses unter Verwendung einer alternativen Strategie erneut kloniert. Rap1A-S17N (Klon B) wurde durch gezielte Mutagenese von Rap1A-WT pDsRed1-C1 erhalten. Unter Verwendung der beiden Primer Rap1AN17.f und Rap1AN17.r wurde die Mutation durch Ein-PCR-Schritt-Mutagenese eingeführt.

Ausgehend von Rap2A pcDNA3 bzw. Rap2B pRK5 wurden die Wildtypsequenzen beider Rap2-Isoformen mit den Primerpaaren Rap2A-N-Bgl2 / Rap2A-C-EcoRI bzw. Rap2B-N-Bgl2 / Rap2B-C-EcoRI durch PCR amplifiziert. Unter Verwendung der so eingeführten BglII- und EcoRI-Schnittstellen wurden die PCR-Produkte in pDsRed1-C1 ligiert.

Ausgehend von den so erhaltenen Plasmiden wurden die konstitutiv aktiven Mutanten Rap2A-G12V und Rap2B-G12V mittels Ein-PCR-Schritt-Mutagenese kloniert. In beiden Fällen dienten dazu die für Rap2A designten Primer Rap2A-G12V-f und Rap2A-G12V-r. Daher enthält Rap2B-G12V zusätzlich zwei stille Mutationen.

5.4 Subzelluläre Lokalisation von Rap1

Vor der Klärung der Frage, wo in der Zelle Rap durch bestimmte Stimuli aktiviert wird, ist es sinnvoll, zuerst die zelluläre Verteilung von Rap in den hier verwendeten Cos-7 Zellen zu untersuchen. Dies wurde am Beispiel der Isoform Rap1A getan. Cos-7 Zellen sind in ihrer Morphologie sehr heterogen, daher verwundert es nicht, dass die zelluläre Verteilung von Rap1 ebenfalls variiert. Abb. 5.4 A zeigt zwei LSM-Aufnahmen von DsRed1-markierten Rap1. Charakteristisch ist die starke Expression im perinukleären Bereich. Dabei findet man Rap1 entweder stark akkumuliert in einer mikroskopisch nicht weiter auflösbaren Struktur direkt am Kern oder in Vesikelwolken die in Richtung Kern dichter werden. Je nach beobachteter Zelle können sich diese Vesikel über das gesamte Cytoplasma verteilen. In einigen Zellen wurde auch eine Konzentrierung an sich ausbreitenden Zellfortsätzen beobachtet (nicht gezeigt). Rap1 findet man in den meisten Zellen auch in der Plasmamembran, wenn auch, verglichen mit der Expression in inneren Membranen, nur schwach exprimiert. Diese Plasmamembranfärbung neben dem starken perinukleären Signal darzustellen, ohne dieses dabei überzuexponieren, war in vielen Fällen technisch nicht möglich. Wenn also in den im Folgenden gezeigten Aufnahmen keine Plasmamembranlokalisation sichtbar ist, kann diese trotzdem vorhanden sein.

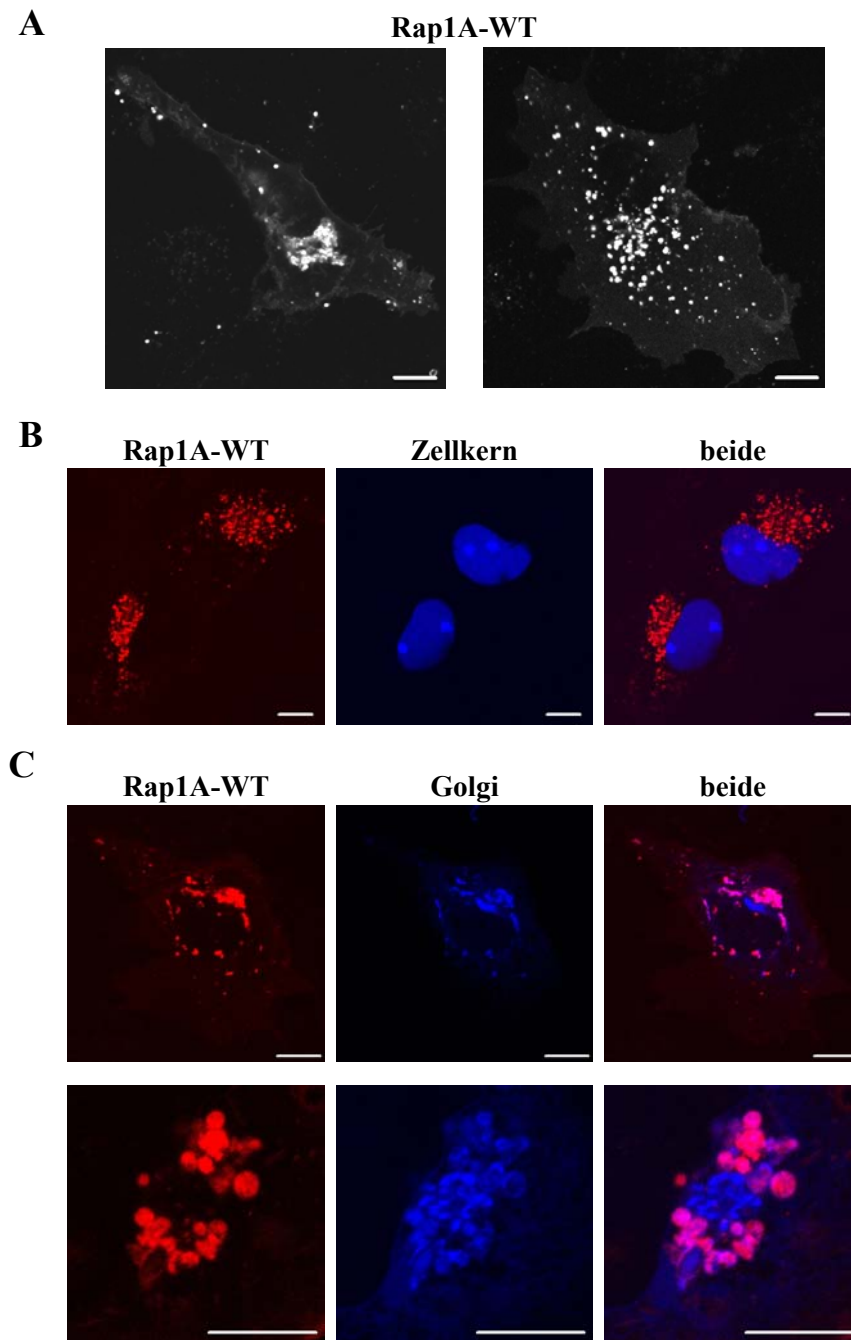
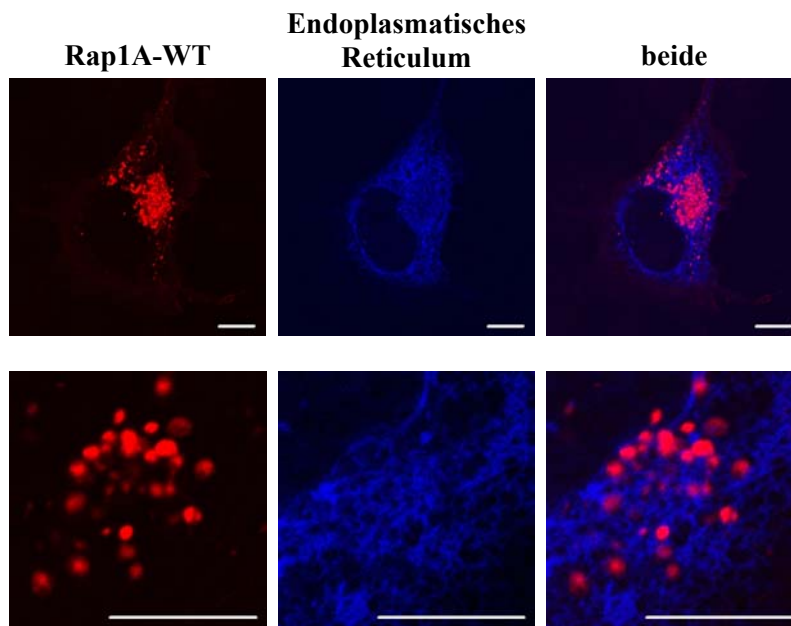
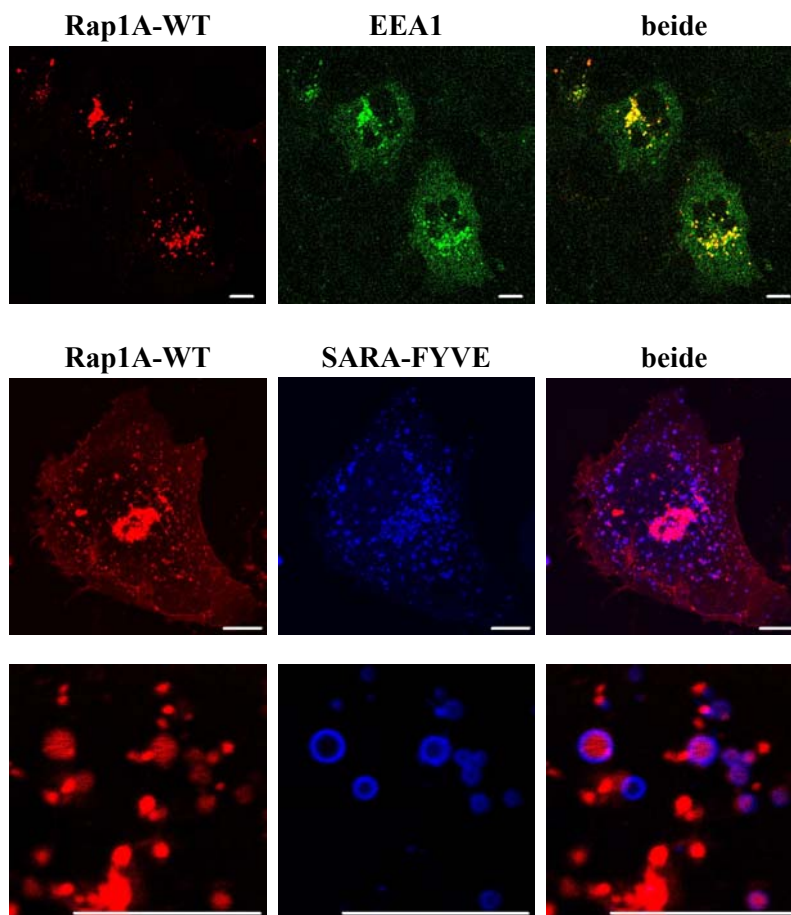


Abb. 5.4 Subzelluläre Lokalisation von Rap1A

Cos-7 Zellen wurden mit DsRed-Rap1A-WT allein (**A**) oder zusammen mit CFP-Nucleus (**B**), CFP-Golgi (**C**), GFP-EEA1 (**D**), CFP-SARA-FYVE (**D**) oder CFP-ER (**E**) transient transfiziert und nach 48 h im LSM aufgenommen.

Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

E**D**

In Abb. 5.4 B sind die Zellkerne durch einen CFP-fusionierten Kernmarker visualisiert. Typischerweise nehmen die Zellkerne in Cos-7 Zellen eine nierenähnliche Form ein, die durch eine leichte Einbuchtung auf einer Seite des Kernes entsteht. An ebendieser Stelle findet man auch die Rap enthaltenen Vesikelwolken. Da sich in diesem perinukleären Bereich auch der Golgi-Apparat erwartet wird, liegt die Vermutung nahe, dass sich Rap am Golgi befindet. Koexpression mit einem Golgimarker zeigt, dass sich dieser und Rap tatsächlich in dem beschriebenen perinukleären Bereich befinden (Abb. 5.4 C). Bei genauerem Blick fällt aber auf, dass die stark exprimierenden Bereiche beider Proteine nicht überlappen. An Stellen an denen viel Rap beobachtet wird, ist das Signal vom Golgi relativ schwach und umgekehrt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine eventuell unterschiedliche Verteilung beider innerhalb der einzelnen Golgikompartimente. Die Beantwortung dieser Frage wird noch dadurch erschwert, dass sich in dem perinukleären Bereich auch endosomale Membranen befinden, in denen ebenfalls Rap nachgewiesen werden kann (Abb. 5.4 D). Ein häufig verwendeter Endosomenmarker ist EEA1 (early endosomal antigene 1). Rap kolokalisiert in Kernnähe überzeugend mit EEA1. Aufgrund des relativ schwachen und diffusen Signals des EGFP-markierten EEA1, wurde ECFP-SARA-FYVE, ein weiterer endosomaler Marker, verwendet. Charakteristisch für endosomale Membranen ist ein hoher Anteil an dem Phospholipid Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI(3)P). Endosomale Proteine wie SARA nutzen dies, um über die PI(3)P-erkennende FYVE-Domäne selektiv an Endosomen zu binden (Hayakawa, 2004). Mit ECFP-SARA-FYVE ist eine sehr gute Färbung der Vesikelmembran möglich. Ähnlich den Rap enthaltenen Vesikeln konzentrieren sich die endosomalen Vesikel in Kernnähe. Bei stärkerer Vergrößerung ist zu erkennen, dass die meisten, wenn auch nicht alle, Endosomen Rap enthalten. Allerdings lässt sich nur ein Teil der Rap enthaltenen Vesikel auch mit SARA-FYVE färben. Auffallend ist dabei, dass dies vor allem schwächer exprimierende Vesikel sind. Vesikel mit stärkerem Rap-Signal sind offenbar keine Endosomen.

Ein Marker für das Endoplasmatische Reticulum kolokalisiert nicht mit Rap (Abb. 5.4 E). Das Endoplasmatische Reticulum zieht sich in einem Netzwerk aus dichtgepackten Strängen durch die Zelle und zeigt keine vesikulären Formen. Auch wird keine Konzentration in dem perinukleären Bereich in dem sich Golgi und ein Teil der Endosomen befinden beobachtet. Dementsprechend befinden sich die Rap enthaltenen Vesikel auch nicht im Endoplasmatischem Reticulum.

5.5 Verwendbarkeit der RGR-Trimere als Rap-GTP-Sonden

Nachdem nun ein breites Panel an Rap-GTP-Sonden mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften kloniert wurde, sollten diese *in vivo* getestet werden. In den nachfolgend geschilderten Experimenten wurden ausschließlich fluoreszenzmarkierte Proteine verwendet. Der Einfachheit halber wird des Weiteren auf die Erwähnung der einzelnen Fluoreszenzmarker verzichtet.

5.5.1 RGR-Oligomerisierung verbessert die Translokation zu aktivem Rap1

Exprimiert man die unveränderte monomere RalGDS-Bindedomäne (RGR-WT-1) in Cos-7 so verteilt sich diese, genau wie freies GFP, gleichmäßig im Cytoplasma (Abb. 5.5 A). Von der cytoplasmatischen Färbung heben sich vor allem im perinukleären Bereich nicht gefärbte vesikuläre und tubuläre Strukturen ab. Dies sind membranumschlossene Zellkompartimente, deren Lumen für die Bindedomäne nicht zugänglich ist. In etwa vergleichbarer Intensität wie das Cytoplasma ist auch der Zellkern gefärbt. Dies könnte durch freies EGFP verursacht sein, von dem bekannt ist, dass es die Kernmembran passieren kann. Ob auch RGR-WT-1 diese Fähigkeit besitzt, ist unklar. An der gleichmäßigen cytoplasmatischen Verteilung ändert sich nichts, wenn man die Wildtyp-Bindedomäne di- oder trimerisiert. Sowohl RGR-WT-2 als auch RGR-WT-3 zeigen keine bevorzugte Lokalisation in der Zelle. Nur in seltenen Fällen wurde eine perinucleäre Akkumulation von RGR-WT-3 beobachtet. Dieser liegt wahrscheinlich eine durch Inhibierung der Rap-GAP – Bindung induzierte Rap-GTP – Akkumulation zugrunde (siehe 5.5.7).

Eine Reportersonde, die in der Lage ist endogenes Rap-GTP nachzuweisen, sollte in jedem Fall eine Translokation zeigen, wenn man ihr große Mengen an aktivem Rap anbietet. Bei Koexpression von konstitutiv aktivem Rap1A-G12V, kommt es zu einer deutlichen Akkumulation von RGR-WT-3 an Stellen an denen Rap zu finden ist (Abb. 5.5 B). Sowohl im perinukleären Bereich, als auch an einigen Membranabschnitten findet man ein verstärktes Signal. Auch das Dimer RGR-WT-2 ist in der Lage Rap1A-G12V zu erkennen und für eine nachweisbare Translokation lang und stark genug zu binden. Im Gegensatz dazu ist die Translokation des Monomers RGR-WT-1 zu Rap1A-G12V deutlich schwächer und findet in einigen Zellen gar nicht mehr statt. Demnach ist offensichtlich, dass die Oligomerisierung der Bindedomänen *in vivo* in einer effizienteren Rap-GTP – Bindung resultiert. In den weiteren Versuchen wurden daher in erster Linie die Trimere der Bindedomänen verwendet.

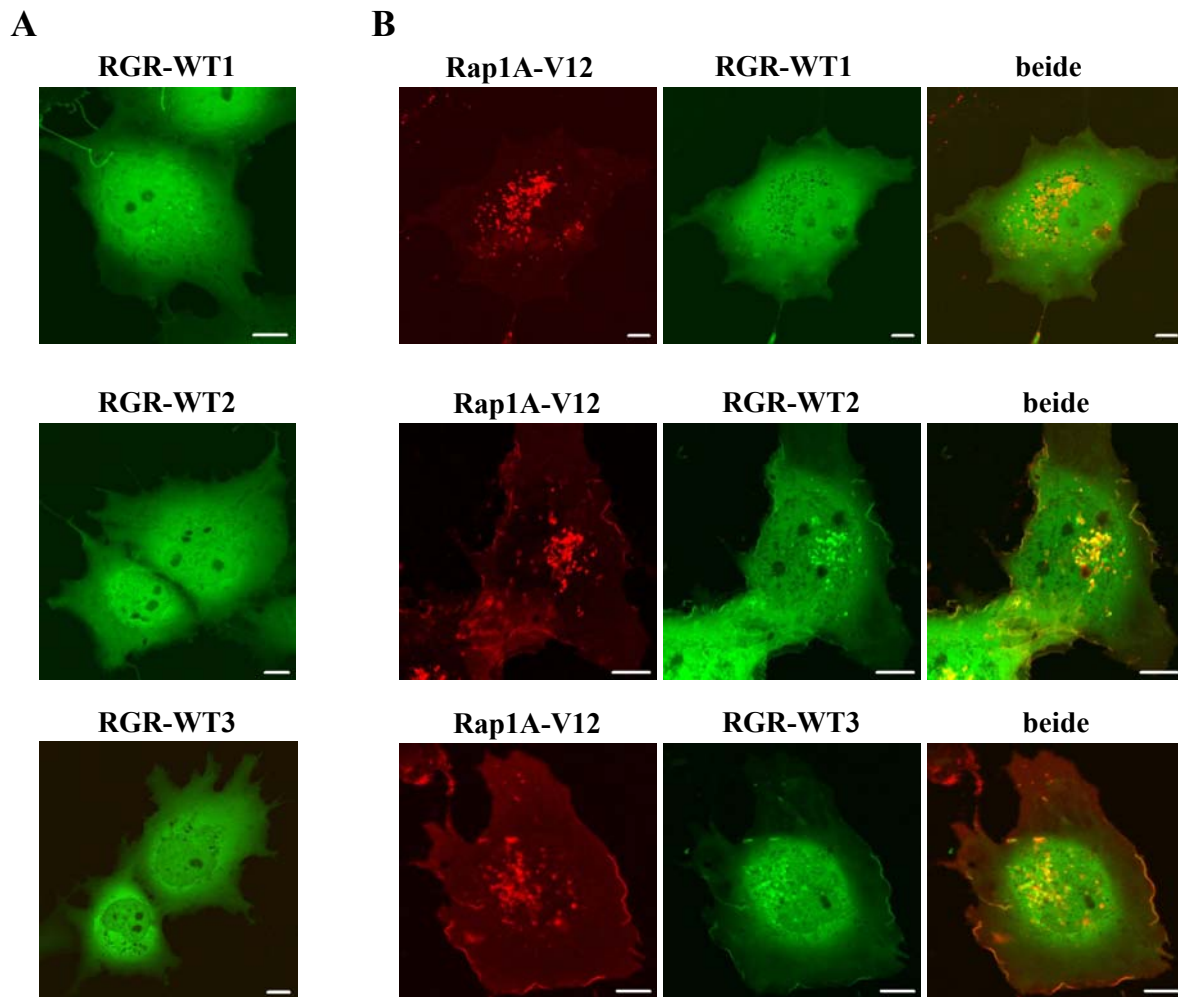


Abb. 5.5 RGR-Oligomerisierung verbessert die Translokation zu aktivem Rap1A

Cos-7 Zellen wurden mit GFP-RGR-WT-1, GFP-RGR-WT-2 oder GFP-RGR-WT-3 allein (**A**) oder zusammen mit DsRed-Rap1A-G12V (**B**) transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, im LSM aufgenommen. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

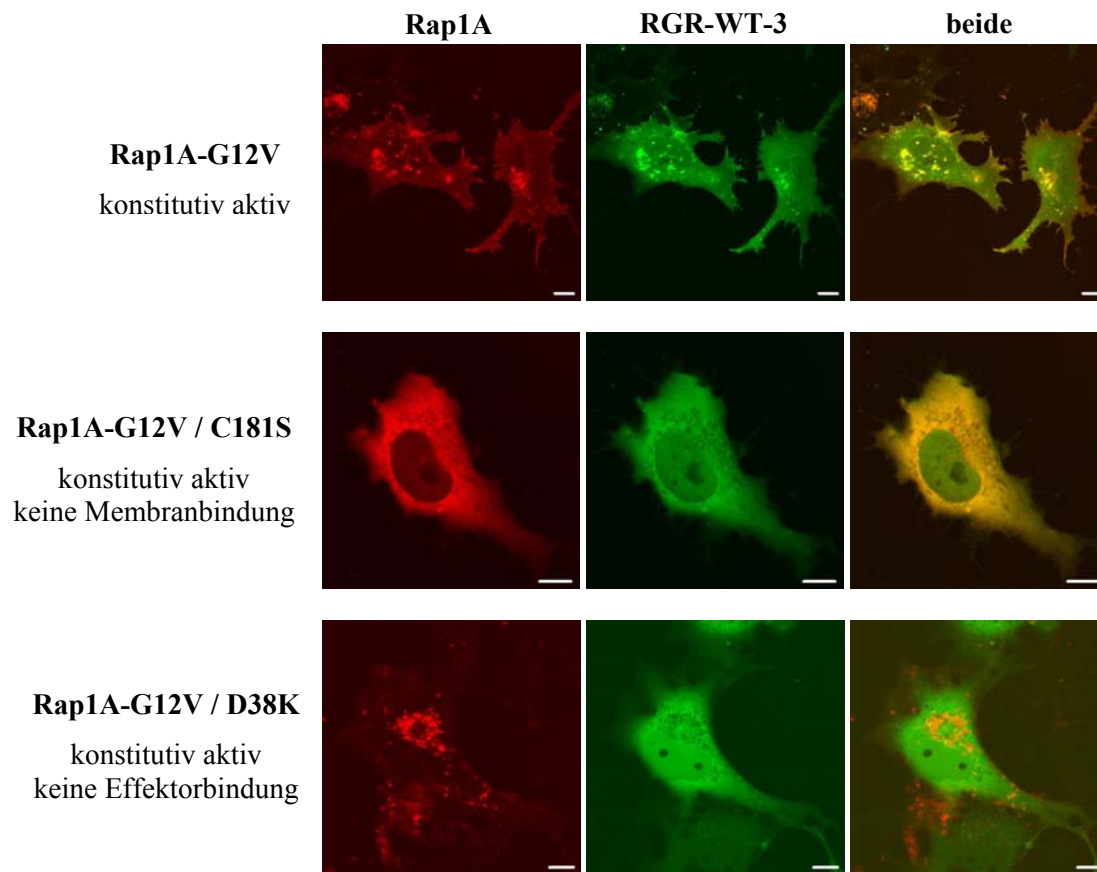


Abb. 5.6 Kolokalisation von RGR-WT-3 mit aktivem Rap1A erfordert deren Assoziation

Cos-7 Zellen wurden mit den angegebenen DsRed-markierten Rap-Mutanten und GFP-RGR-WT-3 transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, im LSM aufgenommen. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

5.5.2 Kolokalisation von RGR-WT-3 und aktivem Rap1 ist bindungsbasiert

Allein die Kolokalisation von RGR-WT-3 mit Rap1A-G12V ist kein ausreichender Nachweis für die *in vivo* Bindung beider. Daher wurden Kontrollen mit Rap1A-Mutanten durchgeführt (Abb. 5.6). Ändert man die zelluläre Verteilung von Rap-G12V durch Mutation der CaaX-Sequenz, was eine Geranylgeranylierung und damit die Integration in die Membran verhindert, so ist nicht nur Rap1A-G12V / C181S sondern auch RGR-WT-3 gleichmäßig im Cytoplasma verteilt. Mutiert man andererseits die Effektorregion von Rap, so dass Bindedomäne diese nicht mehr erkennen kann, nimmt Rap1A-G12V / D38K die für Rap charakteristische Verteilung ein, während RGR-WT-3 keine bevorzugte Lokalisation aufweist. All dies macht deutlich, dass die beobachtete Kolokalisation von RGR-WT-3 mit Rap1A-G12V auf deren Bindung aneinander basiert.

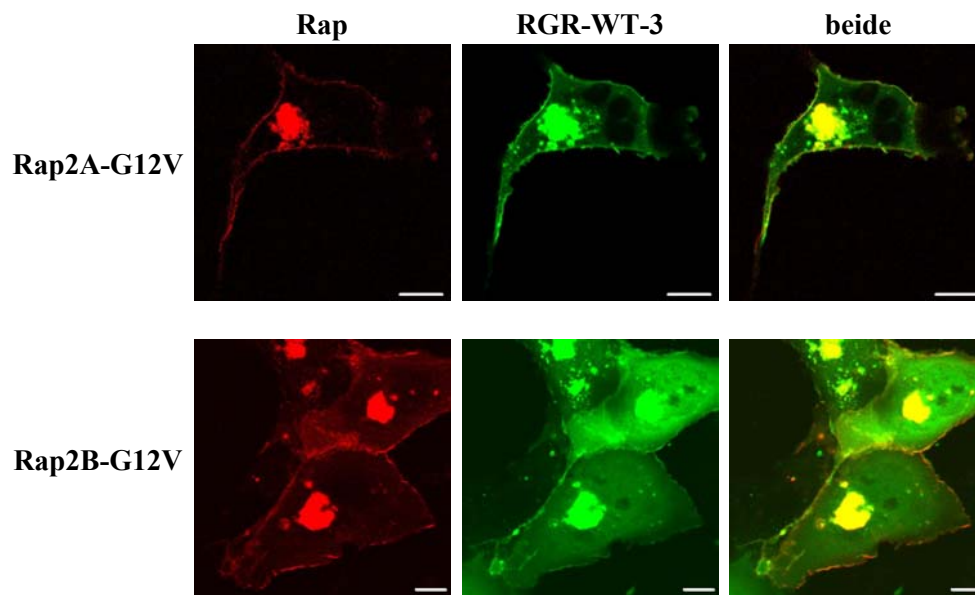


Abb. 5.7 RGR-WT-3 kolokalisiert mit aktivem Rap2

Cos-7 Zellen wurden mit den angegebenen DsRed-markierten Rap-Isoformen und GFP-RGR-WT-3 transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, im LSM aufgenommen.

Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

5.5.3 RGR-WT-3 kolokalisiert mit aktivem Rap2

Die oben aufgeführten Kolokalisationsstudien wurden mit Rap1A durchgeführt. Die zelluläre Verteilung von Rap2A und Rap2B ähnelt der von Rap1. Auffällt nur, dass beide kaum in Vesikeln gefunden werden, sondern nur in kompakter Struktur im perinukleärem Bereich und in der Plasmamembran. RGR-WT-3 kolokalisiert mit konstitutiv aktiven Mutanten von Rap2A und Rap2B, die Effizienz der Rekrutierung ist vergleichbar mit der Rekrutierung zu Rap1A (Abb. 5.7).

DsRed1-markiertes Rap1B stand nicht zur Verfügung. Aufgrund der starken Ähnlichkeit zu Rap1A (95 % Sequenzidentität) ist aber anzunehmen, dass RGR-WT-3 auch diese Isoform erkennt.

5.5.4 RGR-WT-3 kolokalisiert mit aktivem Ras

Bisher ist gezeigt worden, dass RGR-WT-3 in der Lage ist verschiedene Rap-Isoformen in ihrer aktiven Form in der Zelle zu erkennen und mit diesen zu kolokalisieren. Wichtig für eine geeignete Rap-GTP-Sonde ist aber auch, dass sie Rap spezifisch erkennt. Bringt man RGR-WT-3 zusammen mit konstitutiv aktivem Ha-Ras-G12V in Cos-7 Zellen zur Expression, beobachtet man eine sehr deutliche Kolokalisation (Abb. 5.8). Ha-Ras wird anders als Rap vor allem in der Plasmamembran exprimiert. Daneben findet man Ha-Ras auch in einer perinukleären Struktur, die als Golgi-Apparat identifiziert wurde (Chiu, 2002). Verwendet man farnesylisierungsdefizientes Ha-Ras-G12V / C186S, welches im Cytoplasma lokalisiert ist, so befindet sich auch RGR-WT-3 im Cytoplasma (nicht gezeigt). RGR-WT-3 zeigt auch keine Assoziation mit konstitutiv GDP-beladenem Ha-Ras-N17. Es ist also davon auszugehen, dass auch die Kolokalisation von RGR-WT-3 und Ha-Ras durch Assoziation beider verursacht wird. Dies ist nicht völlig unerwartet, da die RalGDS-Bindedomäne nicht nur Rap sondern auch Ras bindet. Erstaunlich ist eher, dass der Unterschied der *in vitro* Affinitäten (K_D 0,01 μ M für Rap und 1,2 μ M für Ras; (Nassar, 1996)) sich *in vivo* nicht in einer unterschiedlich starken Assoziation bzw. Kolokalisation des Trimers widerspiegelt. Die Vermutung liegt nahe, dass die Ursache hierfür eine durch die Trimerisierung verringerte Differenz zwischen den Affinitäten ist. Dies ist aber nicht der Fall, den auch das Monomer RGR-WT-1 transloziert deutlich zu Ha-Ras-G12V, ja scheint dieses sogar besser zu nachzuweisen als Rap1A-G12V. RGR-WT-3 erkennt auch die konstitutiv aktiven Mutanten der Ras-Isoformen K-Ras, M-Ras und TC21 (Abb. 5.8). Im Gegensatz dazu bindet Raf-RBD auch in trimerer Form nicht an Rap1A-G12V (Augsten, 2005).

Folglich ist RGR-WT-3 als Rap-GTP-Sonde nur bedingt geeignet. Um die Aktivierung von Rap vor einem zellulären Hintergrund, bei dem eine Ras-Aktivierung nicht ausgeschlossen werden kann, zu verfolgen, muss eine spezifischere Sonde gefunden werden. Zu diesem Zwecke wurden die zuvor konstruierten Mutanten der RalGDS-Bindedomäne getestet.

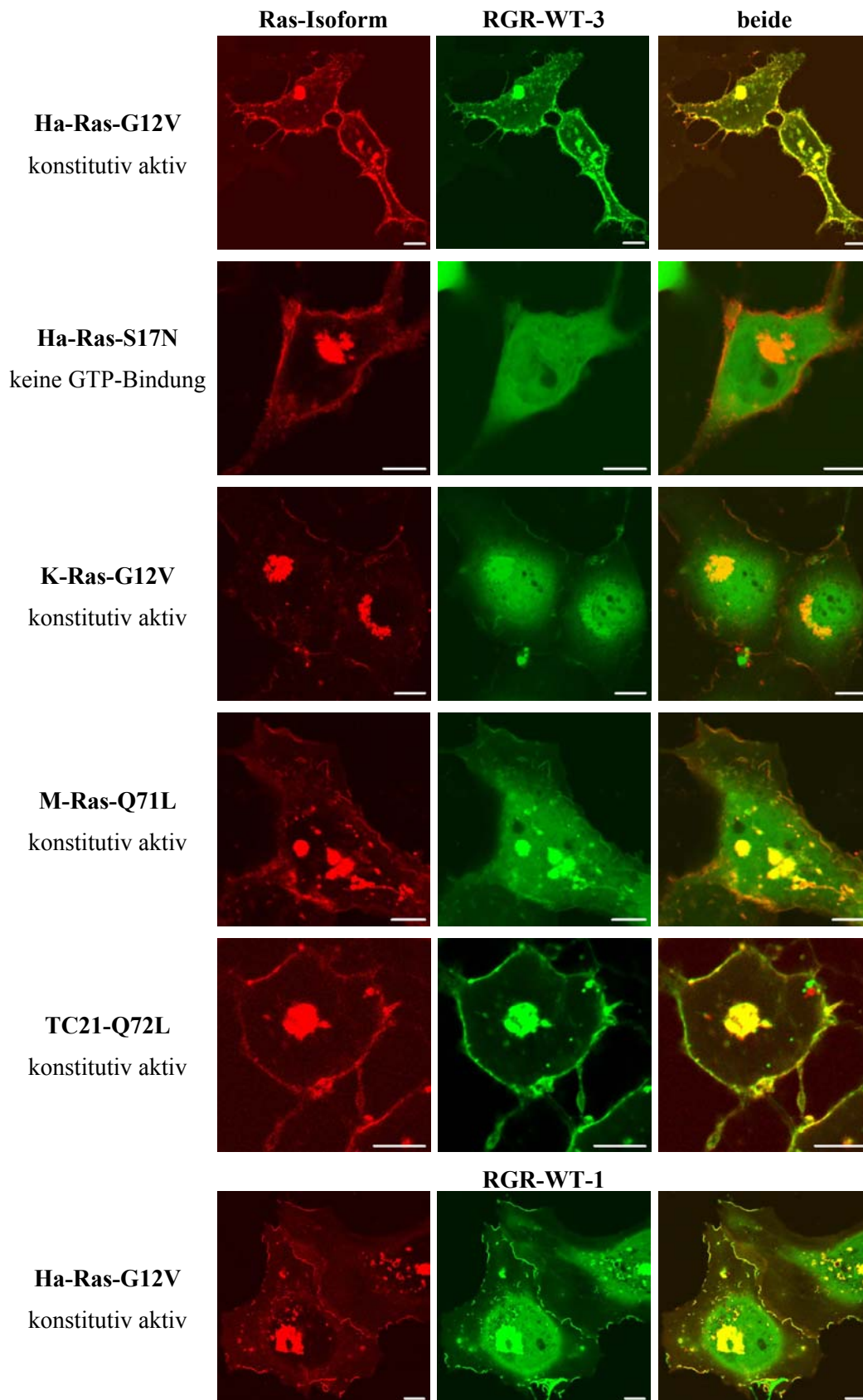


Abb. 5.8 RGR-WT-3 kolokalisiert mit aktiven Ras - Isoformen

Cos-7 Zellen wurden mit den angegebenen DsRed-markierten Ras-Isoformen und GFP-RGR-WT-3 transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, im LSM aufgenommen. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

5.5.5 RGR-K48D-3 ist spezifisch für Rap

Vier Mutanten der RalGDS-RBD wurden in trimerer Form auf ihre Fähigkeit zur Translokation zu konstitutiv aktivem Rap (Abb. 5.9) und Ras (Abb. 5.10) getestet. RGR-44A-3, die Mutante deren Affinität zu Rap verglichen mit dem Wildtyp laut GAP-Assay am geringsten abgeschwächt ist, akkumuliert gut nachweisbar an Stellen an denen sich Rap1A-G12V befindet. Gleiches gilt für RGR-R16A-3, das Trimer der nächst schwächeren Bindedomäne. Allerdings wird auch Ha-Ras-G12V von beiden Mutanten erkannt. Dementsprechend sind RGR-R16A-3 und RGR-K44A-3 ebenso wenig als spezifische Rap-GTP-Sonde geeignet wie RGR-WT-3. Die monomeren Mutanten RGR-H49A-1 und RGR-K48D-1 zeigten im GAP-Assay eine schwächere Bindung an Rap als die Raf-RBD. Die Affinität zu Rap ist also verglichen zur Wildtyp RGR um mehr als das Hundertfache abgesenkt. Trotzdem sind beide in trimerer Form in der Lage mit Rap-G12V zu kolokalisieren. Anders als RGR-H49A-3, welches auch mit Ras-G12V eine vergleichbare Kolokalisation zeigt, bindet RGR-K48D-3 nicht an konstitutiv aktives H-Ras. Auch die Rap-Isoformen Rap2A und Rap2B werden durch RGR-K48D-3 erkannt (Abb. 5.11). Im Gegensatz dazu können konstitutiv aktive Varianten der Ras-Isoformen K-Ras und M-Ras RGR-K48D-3 nicht rekrutieren. Eine sehr schwache aber deutliche Kolokalisation von RGR-K48D-3 wurde mit aktivem TC21 beobachtet. Demnach ist auch RGR-K48D-3 nicht hundertprozentig spezifisch für Rap.

Der relativ große Affinitätsunterschied zwischen RGR-WT-3 und RGR-K48D-3 macht sich *in vivo* nicht dadurch bemerkbar, dass die Translokalisation, wenn sie stattfindet, weniger deutlich ist, sondern eher dadurch, dass die Zahl der Zellen, in denen keine Translokalisation stattfindet, leicht erhöht scheint. Im Fall von RGR-K48D ist auch gut erkennbar, wie stark der Effekt der Oligomerisierung auf die Rekrutierbarkeit durch Rap-GTP sein kann. Während das Monomer auch in Anwesenheit von Rap1A-G12V gleichmäßig im Cytoplasma verteilt ist, kann das Trimer sehr gut Rap-GTP detektieren (Abb. 5.12).

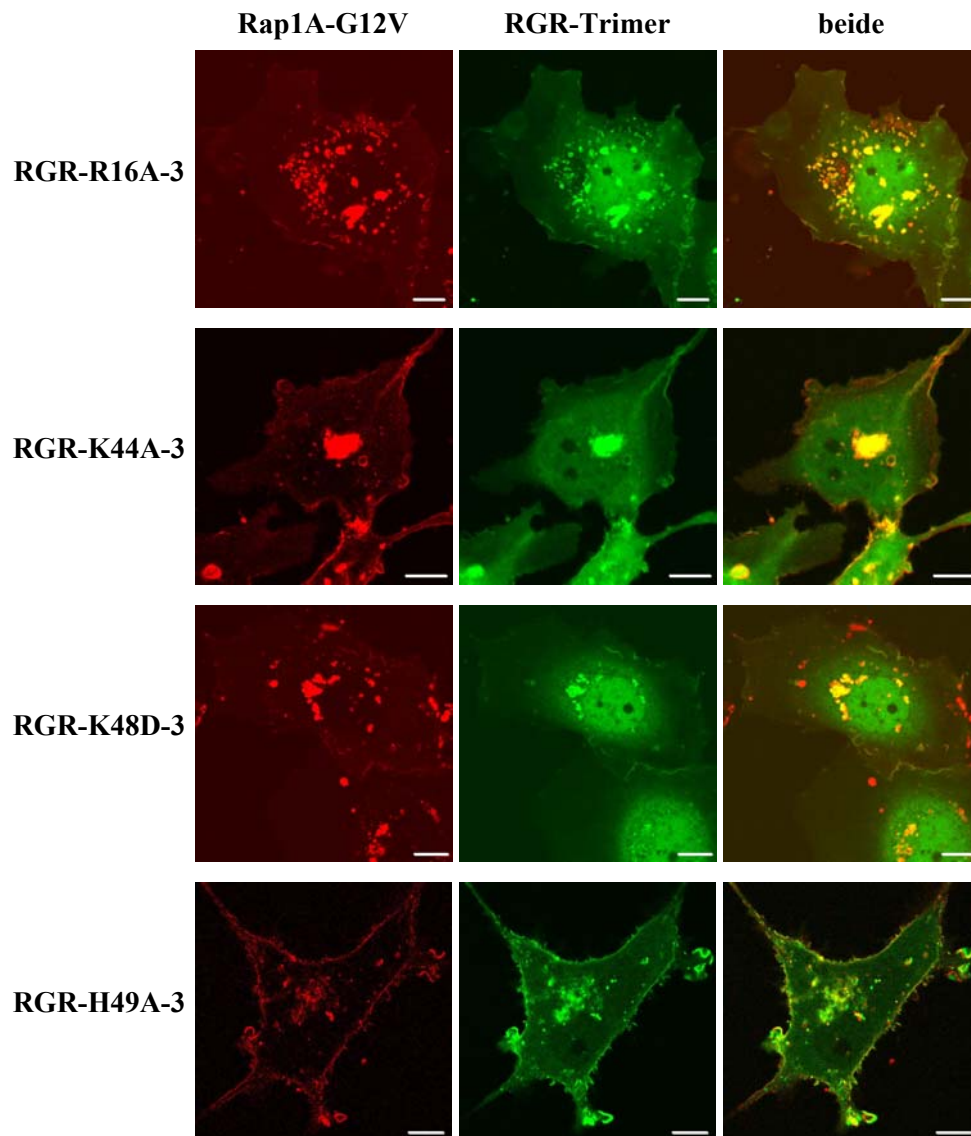


Abb. 5.9 Kolokalisation trimerer RGR-Mutanten mit aktivem Rap1A

Cos-7 Zellen wurden mit den angegebenen GFP-markierten RGR-Trimeren und DsRed-Rap1A-G12V transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, im LSM aufgenommen.

Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

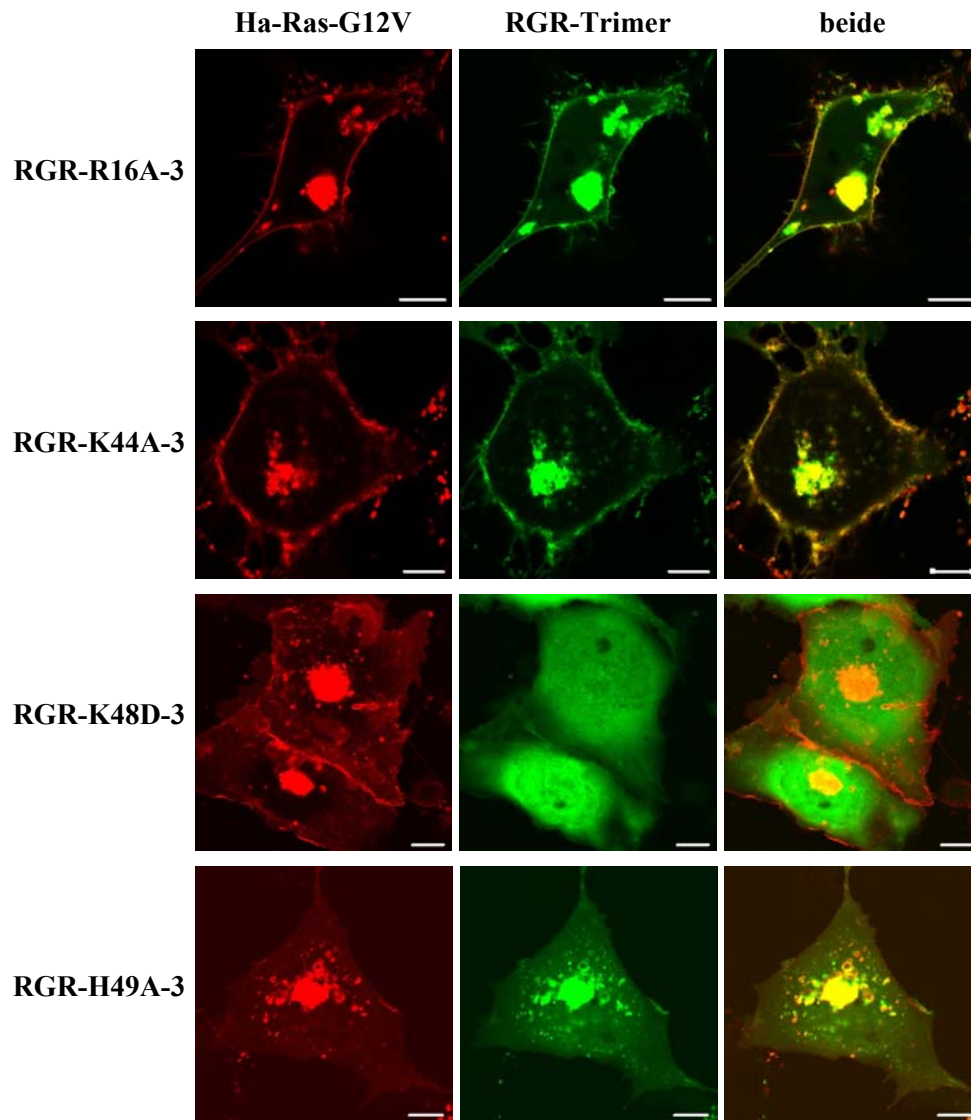


Abb. 5.10 Kolokalisation trimerer RGR-Mutanten mit aktivem Ha-Ras

Cos-7 Zellen wurden mit den angegebenen GFP-markierten RGR-Trimeren und DsRed-Ha-Ras-G12V transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, im LSM aufgenommen.

Der weiße Balken entspricht 10 μm.

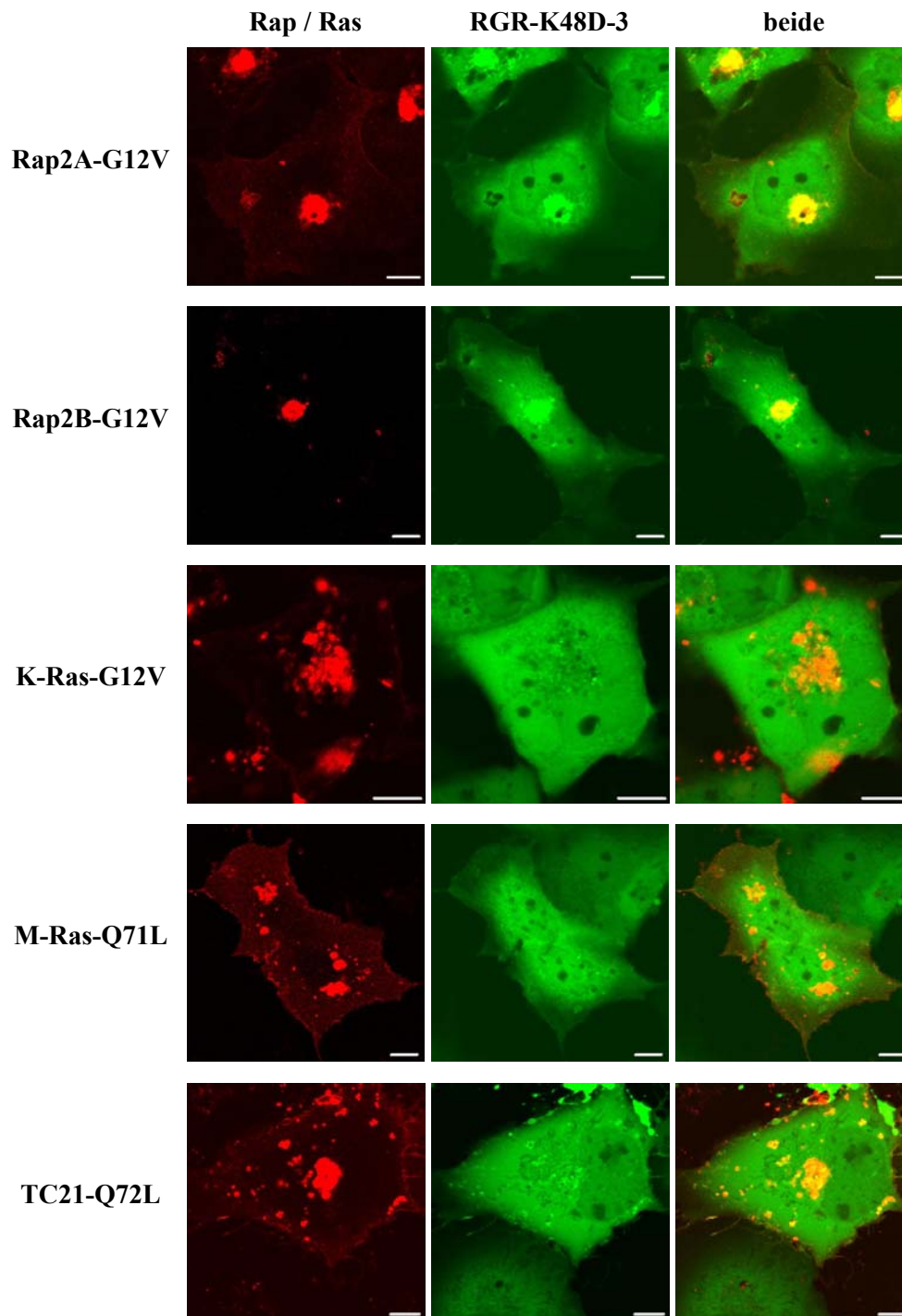


Abb. 5.11 Kolokalisation von RGR-K48D-3 mit aktivem Rap2 und aktiven Ras-Isoformen

Cos-7 Zellen wurden mit den angegebenen DsRed-markierten Rap- bzw. Ras- Isoformen und GFP-RGR-K48D-3 transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serum-freiem Medium, im LSM aufgenommen. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

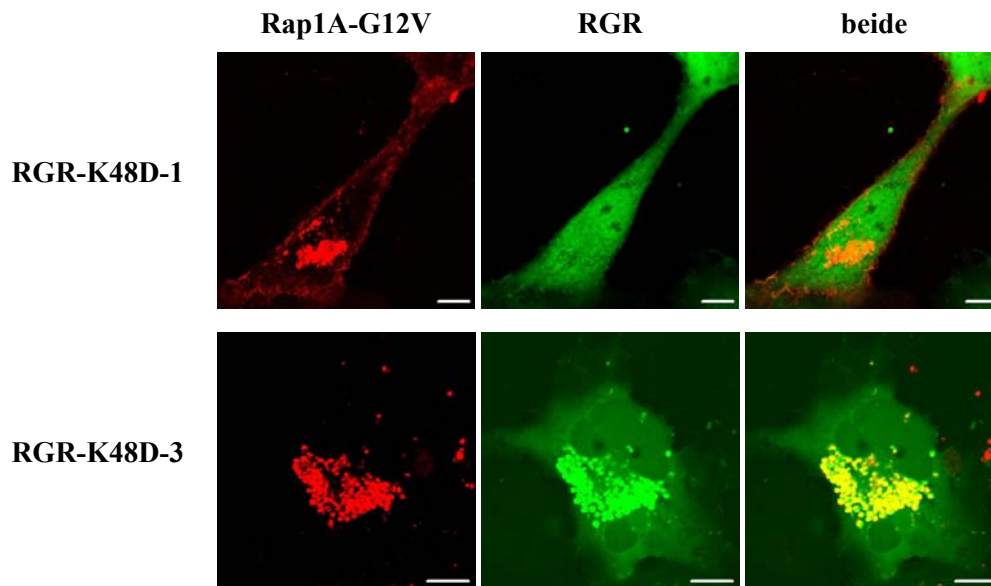


Abb. 5.12 Trimere, aber nicht monomere, RGR-K48D kolokalisiert mit aktivem Rap1

Cos-7 Zellen wurden mit DsRed-Rap1A-G12V und RGR-K48D-1 oder RGR-K48D-3 transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, im LSM aufgenommen. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

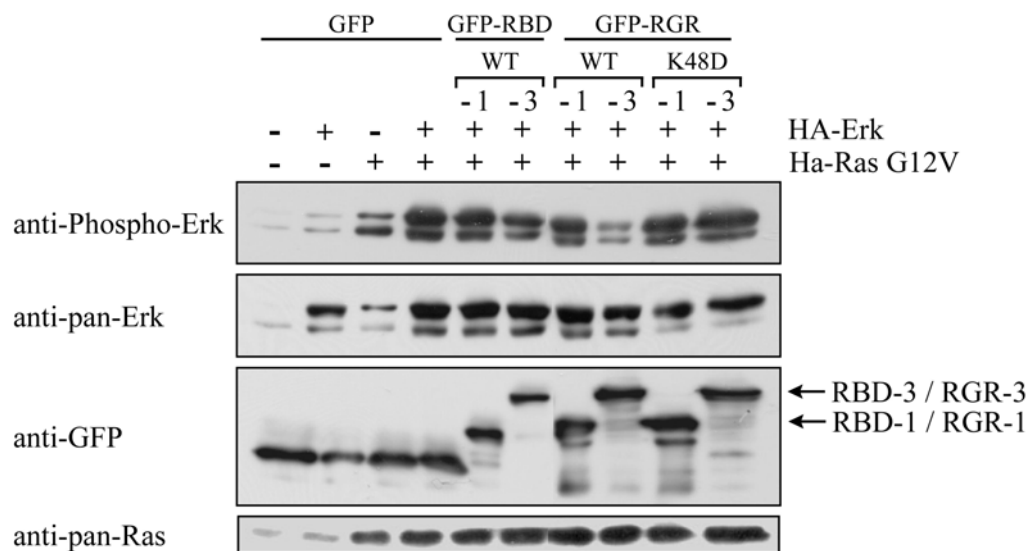


Abb. 5.13 Einfluß von RBDs und RGRs auf die Ras-induzierte Erk-Phosphorylierung

Cos-7 Zellen wurden wie angegeben transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, in Lysispuffer lysiert. Die Zelllysate wurden im Western Blot auf ihren Gehalt an phospho-Erk getestet. Die gleichmäßige Expression von Ha- Erk, Ha-Ras-G12V und der GFP-markierten Bindedomänen wurden mit entsprechenden Antikörper überprüft.

5.5.6 RGR-WT-3, aber nicht RGR-K48D3, inhibiert die Ras-Signaltransduktion

Die *in vivo* Bindung der RGRs an Ras lässt sich auch durch deren Einfluss auf die Ras nachgeschalteten Signaltransduktionsprozesse darstellen (Abb. 5.13). Dazu wurden Ha-Ras-G12V, HA-Erk und verschiedene Bindedomänen in Cos-7 Zellen exprimiert. Konstitutiv aktives Ras induziert die Phosphorylierung von Erk. In Anwesenheit von Raf-RBD-WT-1 ist die Erk-Phosphorylierung leicht verringert. Deutlicher wird die Inhibierung bei Koexpression von Raf-RBD-WT-3. Auch RGR-WT zeigt als Monomer eine leichte und in trimerer Form eine starke Abschwächung des phospo-Erk-Signals. Der Effekt scheint hier sogar noch stärker zu sein als bei der Raf-RBD, dies könnte in der etwas stärkeren Expression der RGR-Oligomere begründet sein. Weder RGR-K48D-1 noch RGR-K48D-3 sind in der Lage an Ras-G12V zu binden und so die Erk-Phosphorylierung zu inhibieren. All dies bestätigt die Ergebnisse der Kolokalisationsanalysen.

5.5.7 Inhibierung der Rap-GAP-Aktivität durch RGRs

Da die verwendeten Bindedomänen, wie im GAP-Assay genutzt, die Bindung von Rap-GAPs an Rap behindern können, wurde getestet inwieweit sich die Expression der Bindedomänen auf die basale Aktivität von endogenem und ektopischem Rap in Serum-gehungerten Zellen auswirkt (Abb. 5.14). Allein die Expression von RGR-WT-3 ist ausreichend um sowohl koexprimiertes als auch endogenes Rap zu aktivieren. Dem liegt höchstwahrscheinlich die Inhibierung der basalen GAP-Aktivität zugrunde. Bei Transfektion von DsRed1-markiertem Rap zusammen mit RGR-WT-3 ist die Expression beider, verglichen mit unmarkiertem Rap, deutlich geringer. Der Effekt der RGR-induzierten Rap-Aktivierung aber ist von vergleichbarem Ausmaß. Die artifizielle Aktivierung von Rap tritt auch bei Expression von RGR-K48D-3 auf, ist allerdings verglichen mit RGR-WT-3 sehr stark abgeschwächt.

Auch in Kolokalisationsstudien mit Rap-WT zeigte sich, dass basale Aktivität ausreicht um RGR-WT-3 zu rekrutieren und so wahrscheinlich die GAP-vermittelte Inaktivierung zu unterbinden, was eine gut detektierbare Rap-GTP – Akkumulation zur Folge hat (Abb. 5.15). Dies wurde mit allen Rap-Isoformen beobachtet. Auch das Dimer RGR-WT-2 kann die RapGAP-Funktion ausreichend stören und kolokalisiert mit Rap-WT. Während RGR-WT-3 in allen untersuchten Zellen mit Rap1A-WT kolokalisiert, wird dies nur für einige der RGR-K48D-3 transfizierte Zellen beobachtet. Der Großteil der Zellen hingegen zeigt keine Rekrutierung von RGR-K48D-3. Die Stärke der RGR-K48D-3 – Bindung an Rap scheint demnach die Regulation durch endogene GAP-Aktivität gerade noch zu zulassen.

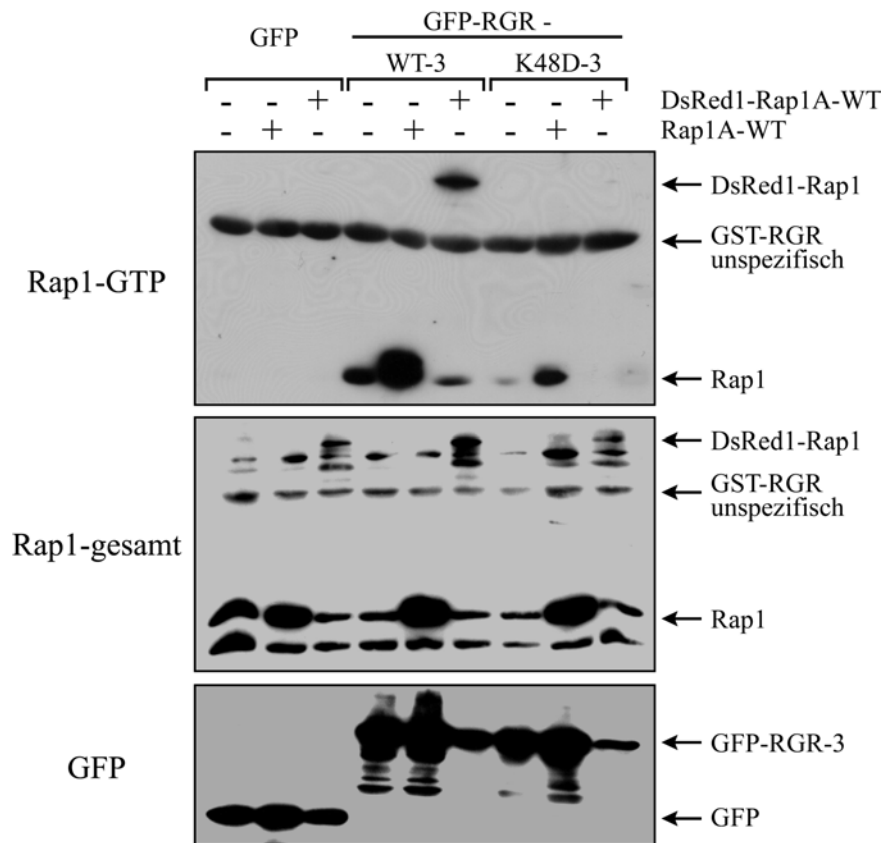


Abb. 5.14 Rap-GTP – Akkumulation durch trimere RGRs

Cos-7 Zellen wurden wie angegeben transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, einem GST-RGR Pull Down zugeführt. Isoliertes Rap1-GTP wurde im Western Blot detektiert. Western Blot der Zelllysate zeigt die Menge an gesamtem Rap1 und an GFP-RGR-WT-3, GFP-RGR-K48D-3. Die hohe Konzentration an GST-RGR im Pull Down und im Zelllysate führt zur unspezifischen Bindung des anti-Rap1-Antikörpers.

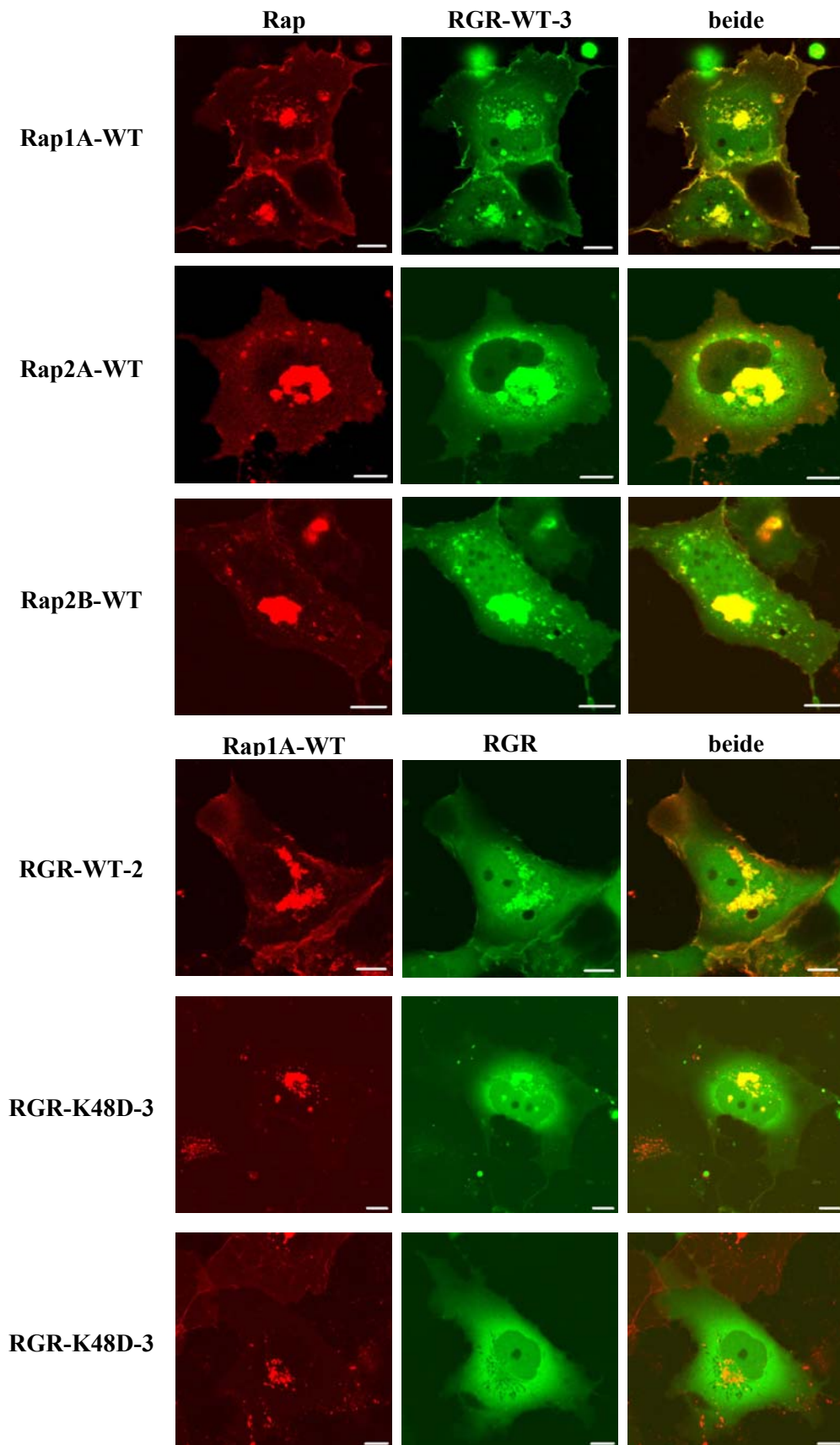


Abb. 5.15 Kolokalisation der RGRs mit Wildtyp Rap

Cos-7 Zellen wurden wie angegeben mit DsRed-markierten Rap-Isoformen und GFP-markierten RGRs transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, im LSM aufgenommen. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

5.6 Visualisierung extrazellulär stimulierter Rap-Aktivierung

5.6.1 Endogene Rap-Aktivierung in TPA stimulierten Cos-7 Zellen

Kolokalisationsanalysen zeigen RGR-K48D-3 als eine ausreichend spezifische Sonde für Rap-GTP, die *in vivo* zu überexprimiertem aktivem Rap transloziert, ohne dabei die Deaktivierung von Rap zu stark zu inhibieren. Um zu testen, ob RGR-K48D-3 auch in der Lage ist die Aktivierung von endogenem Rap zu detektieren, wurden Cos-7 Zellen mit TPA stimuliert, was in der Aktivierung von Rap resultiert (Abb. 5.16). In RGR-K48D-3 exprimierenden Zellen wurden nach TPA-Stimulation drei unterschiedliche Muster der Rap-Aktivierung beobachtet.

Bei 46 % der Zellen wurde eine Plasmamembranlokalisation der Reportersonde beobachtet (Abb. 5.17 A). Dies beschränkte sich auf meist kurze Membranabschnitte mit *Membrane Ruffling* und beginnt typischerweise wenige Minuten (5-10) nach TPA-Zugabe. Die erhöhte Plasmamembranlokalisation ist dabei scharf abgegrenzt. An sich ausbildenden Lamellipodien, trat ein anderes Muster der Rap-Aktivierung auf. Hier akkumuliert RGR-K48D-3 stark in einem diffusen Bereich an der sich ausbreitenden Zellfront (Abb. 5.17 B). Im Gegensatz zur Rap-Aktivierung an *Membrane Ruffles* kommt es zur Lamellipodien-Bildung erst nach 10 - 20 min TPA-Behandlung. Auch reagierten nur einige Zellen (17 %) mit der Bildung von Lamellipodien. Sowohl an *Membrane Ruffles* als auch an Lamellipodien wird Rap an der Plasmamembran aktiviert. Eine auf dem ersten Blick anscheinend cytoplasmatische RGR-K48D-3 Rekrutierung wurde bei 17 % der Zellen beobachtet (Abb. 5.17 C). Diese beginnt mit einer punktuellen Akkumulation der Bindedomäne im Cytoplasma. An diesen Stellen bilden sich dann große Vesikel aus, die von aktivem Rap umgeben sind. Die Vesikel enthalten keine Bindedomäne und zeichnen sich daher von der cytoplasmatischen Fluoreszenz ab. Die Größe der Vesikel (1,5-3 µm) lässt vermuten, dass es sich dabei um Makropinosomen handelt. Eine derartige Rap-Aktivierung wurde zwar nicht direkt am Rand aber doch im peripheren Bereich der Zelle beobachtet. In der Peripherie ist die Zelldicke relativ gering. Daher ist anzunehmen, dass die Oberfläche der Zelle innerhalb oder aber knapp oberhalb des beobachteten optischen Schnittes liegt. Sich an der Plasmamembran abschnürende pinocytotische Vesikel würden in diesem Falle auf dem ersten Blick den Eindruck erwecken als entstehen sie im Cytoplasma. Die Rap-Aktivierung an sich ausbildenden Vesikeln beginnt relativ schnell, meistens innerhalb der ersten fünf Minuten, nach TPA-Stimulation. Die Akkumulation von RGR-K48D-3 kann transient oder aber länger anhaltend sein. Auch ohne Rap-Aktivierung sind die entstandenen Vesikel noch sichtbar. Das Abklingen des GFP-Signals kommt also nicht dadurch zustande, dass diese den optischen Schnitt verlassen. RGR-K48D-3 Rekrutierung zu *Membrane Ruffles* und Lamellipodien tritt, wenn es an mehreren Stellen der Zelle geschieht, häufig zeitlich versetzt auf. Dagegen fällt bei der Aktivierung an Vesikeln auf, dass diese mit nahezu gleicher Kinetik an unterschiedlichen Stellen der Zelle ablaufen.

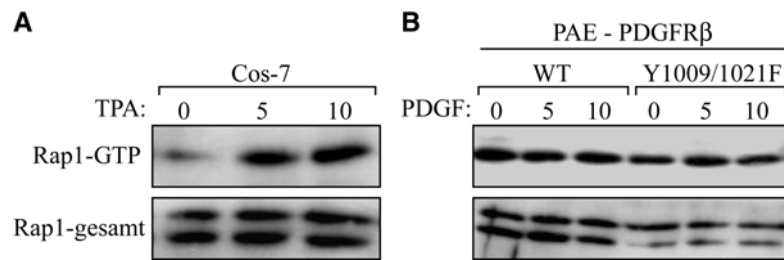


Abb. 5.16 Rap-Aktivierung in Cos-7 und PAE Zellen

(A) Cos-7 Zellen wurden nach 24 h Hungern in serumfreiem Medium für 5 und 10 min mit 1 μ M TPA stimuliert oder unbehandelt gelassen. (B) PAE PDGFR β – und PAE PDGFR β -Y1009/1021F – Zellen wurden nach 24 h Hungern in serumfreiem Medium für 5 und 10 min mit 50 ng/ml TPA stimuliert oder unbehandelt gelassen. Rap1-GTP wurde mittels GST-RGR Pull Down isoliert und im Western Blot detektiert. Western Blot der Zelllysate zeigt die Menge an gesamtem Rap1.

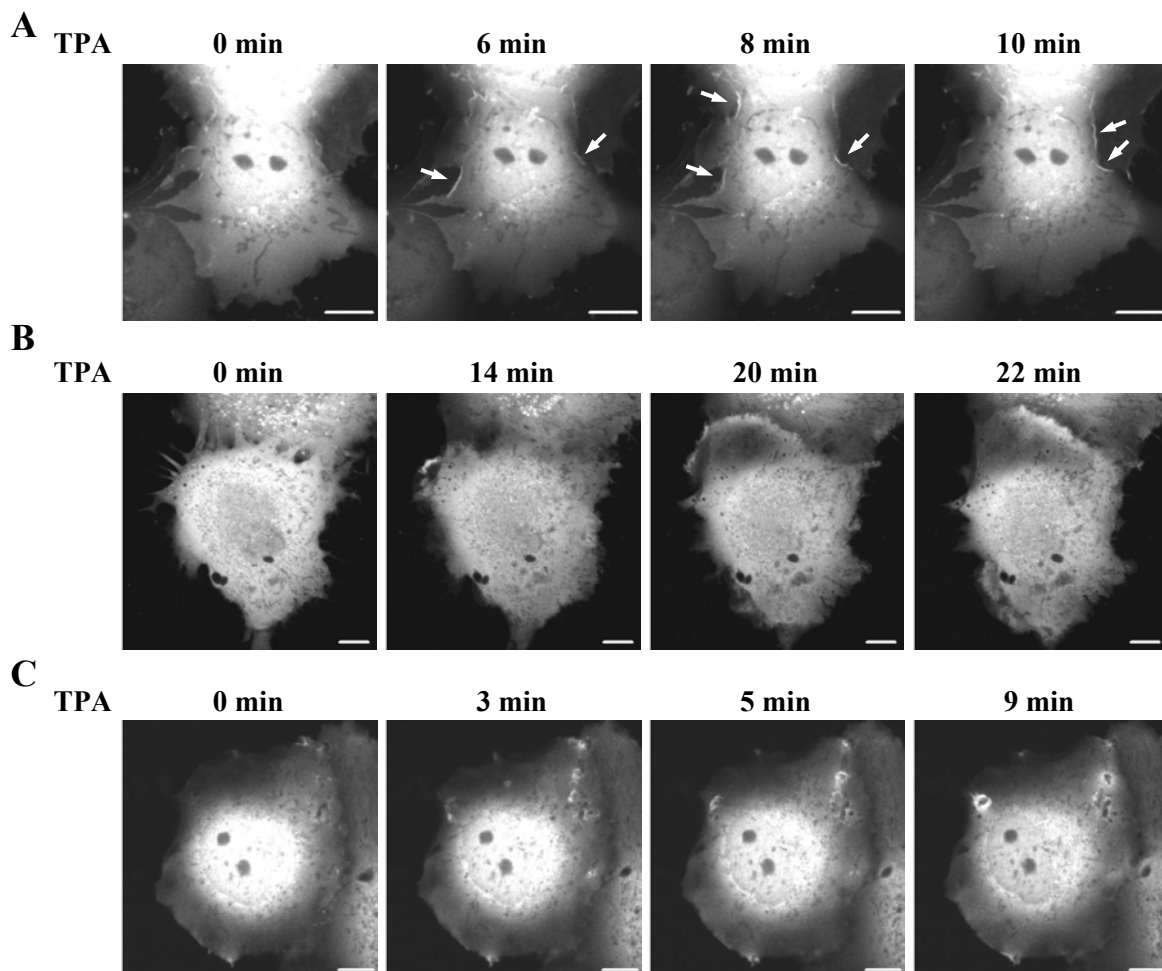


Abb. 5.17 Drei Muster der TPA-induzierten Rap-Aktivierung

Cos-7 Zellen wurden mit GFP-RGR-K48D-3 transient transfiziert. 48 h nach Transfektion, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, wurden die Zellen mit 1 μ M TPA stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten im LSM aufgenommen. Rap-Aktivierung wurde an *Membrane Ruffles* (A), *Lamellipodien* (B) und bei der Bildung großer Vesikel (C) beobachtet. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

5.6.2 Inhibierung der Rap-Aktivierung verhindert RGR-K48D-3 – Akkumulation

Um auszuschließen, dass die beobachtete RGR-K48D-3 – Rekrutierung nicht auf einer Rap-unabhängigen unspezifischen Akkumulation durch z.B. veränderte Zelldicke an *Membrane Ruffles* zustande kommt, wurde als Negativkontrolle ein Zellsystem gewählt in dem Rap nicht aktiviert wird. Der PDGF-Rezeptor aktiviert PLC- γ 1-abhängig Rap. Diese muss um aktiviert zu werden über ihre SH2-Domänen an Phosphotyrosinreste des PDGF-Rezeptors binden. Eine Rezeptormutante (PDGFR β -Y_{1009/1021}F), in der die entsprechenden Tyrosinreste durch Phenylalanin substituiert sind, kann PLC- γ 1 nicht aktivieren. PAE-Zellen, die stabil mit dem PDGFR β -WT transfiziert sind, aktivieren Rap nach Stimulation mit PDGF. Dies bleibt bei PDGFR β -Y_{1009/1021}F exprimierenden PAE-Zellen aus (Zwartkruis, 1998). Aufgrund einer sehr hohen basalen Rap-Aktivierung ist es in dieser Arbeit nicht gelungen, diese in der Literatur beschriebenen Daten zu reproduzieren. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die relative hohe basale Rap-Aktivität in PAE PDGFR β – Zellen, über die hinaus im GST-RGR Pull Down keine PDGF-induzierte Rap-Aktivierung nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.16).

Nichtsdestotrotz wurde die PDGF-induzierte Rap-Aktivierung in beiden Zelllinien mittels RGR-K48D-3 untersucht. Die Reportersonde verhält sich in PAE Zellen ebenso wie in Cos-7 Zellen, dass heißt sie wird zu konstitutiv aktivem Rap1A-G12V rekrutiert, während Ha-Ras-G12V nicht erkannt wird (Abb. 5.18).

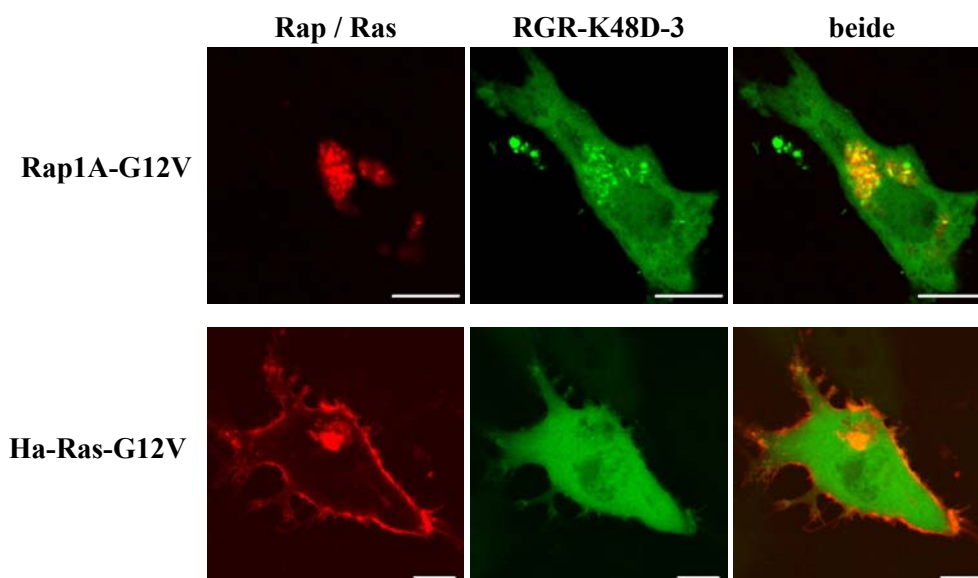


Abb. 5.18 RGR-K48D-3 kolokalisiert mit aktivem Rap, aber nicht Ras, in PAE-Zellen

PAE PDGFR β – Zellen wurden mit GFP-RGR-K48D-3 zusammen mit DsRed-Rap1A-G12V oder DsRed-HaRas-G12V transient transfiziert und nach 48 h, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, im LSM aufgenommen. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

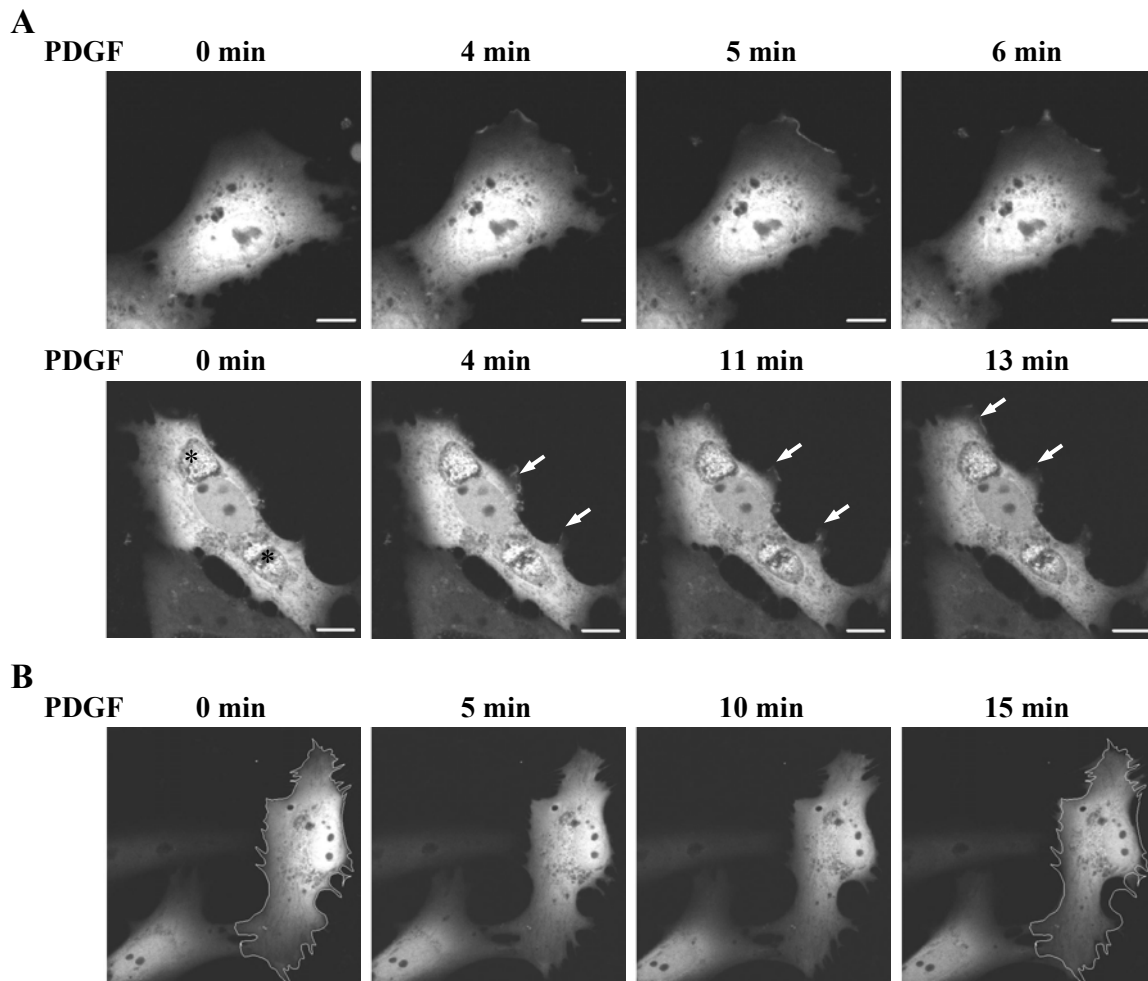


Abb. 5.19 Inhibition der PDGF-induzierten Rap-Aktivierung verhindert RGR-K48D-3

Akkumulation

PAE PDGFR β – Zellen (**A**) und PAE PDGFR β -Y_{1009/1021}F – Zellen (**B**) wurden mit GFP-RGR-K48D-3 transient transfiziert. 48 h nach Transfektion, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, wurden die Zellen mit 50 ng/ml PDGF stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten im LSM aufgenommen. Pfeile zeigen Region der Rap-Aktivierung an der Plasmamembran. „*“ markiert perinucleäre Strukturen (vermutlich Golgi-Apparat) mit basaler Rap-Aktivität. Zur Verdeutlichung der Änderung der Zellform ist in (**B**) der Zellumfang vor PDGF-Stimulation markiert. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

In PAE-Zellen mit intaktem PDGF-Rezeptor stimuliert PDGF die Membranrekrutierung der Reportersonde in 33% der Messungen (Abb. 5.19 A). Dies beginnt innerhalb der ersten fünf Minuten nach PDGF-Zugabe und tritt entweder an sehr kurzen Membranbereichen mit Membrane Ruffling, oder aber an längeren Abschnitten auf. Eine Rap-Aktivierung an der Plasmamembran trat in keiner der untersuchten PAE PDGFR β -Y_{1009/1021}F – Zellen auf, obwohl auch hier Bereiche mit *Membrane Ruffling* beobachtet wurden (Abb. 5.19 B). Demzufolge sind die in PAE PDGFR β – Zellen beobachteten Membranrekrutierungen der Reportersonde nicht unspezifisch, sondern abhängig von der Rap-GTP – Bildung. Die beobachtete Rap-Aktivierung ist zeitlich und räumlich beschränkt und findet zudem nicht in allen Zellen statt. Demnach ist die Menge an Plasmamembran lokalisiertem aktivem Rap nur ein kleiner Teil

des gesamten Rap-Pools. Dies kann erklären, warum die in der Literatur beschriebene PDGF-induzierte Rap-Aktivierung hier vor dem hohen Hintergrund an basal aktivem Rap im GST-RGR Pull Down nicht nachgewiesen werden konnte. Alternativ könnte die Rap-GTP – Akkumulation an der Plasmamembran weniger auf einer Erhöhung des Rap-GTP – Spiegels, sondern auf der Translokation von Rap-GTP beruhen. Der Pool des auch in ruhenden Zellen GTP-beladenen Rap befindet sich im perinukleären Bereich, hier kommt es in den meisten Zellen zur starken Akkumulation der Reportersonde (Abb. 5.19 A, unteres Panel). Koloalisionsstudien mit Golgi- und Endosomen- Markern, legen nahe, dass es sich dabei hauptsächlich um Golgi-lokalisiertes Rap handelt (nicht gezeigt).

5.6.3 Rap-Aktivierung ist verbunden mit Translokation zur Plasmamembran

Sowohl in Cos-7 als auch in PAE Zellen wurde die Aktivierung von Rap nur an der Plasmamembran beobachtet. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die überexprimiertes Rap-GTP nur an der Plasmamembran von Cos-1 Zellen bzw. humanen Megakaryocyten detektieren (Balduini, 2004; Bivona, 2004). In beiden Fällen ist dies mit der Translokation von Rap an die Plasmamembran verbunden. Um zu testen, ob dies auch in TPA-stimulierten Cos-7 Zellen der Fall ist, wurden diese mit DsRed1-markiertem Rap1A und RGR-K48D-3 kotransfiziert (Abb. 5.20). Vor Stimulation befindet sich Rap1 fast ausschließlich im perinukleären Bereich und in einigen Vesikeln. Eine basale Koloalision mit RGR-K48D-3 tritt im gezeigten Fall nicht auf. Ungefähr 5-10 Minuten nach TPA-Behandlung ist eine Rekrutierung von Rap1 an distinkte Bereiche der Plasmamembran zu beobachten. Auch RGR-K48D-3 wird an diesen Stellen konzentriert, folglich ist Plasmamembran-rekrutiertes Rap1 GTP-beladen. Während der gesamten Messung ist die homogene intrazelluläre Verteilung von RGR-K48D-3 unverändert. Dies ist aus Abb. 5.20 nicht ersichtlich, da es nötig war, eine hohe Intensität des GFP-Signals zu wählen, um die Aktivierung an der Plasmamembran sichtbar zu machen.

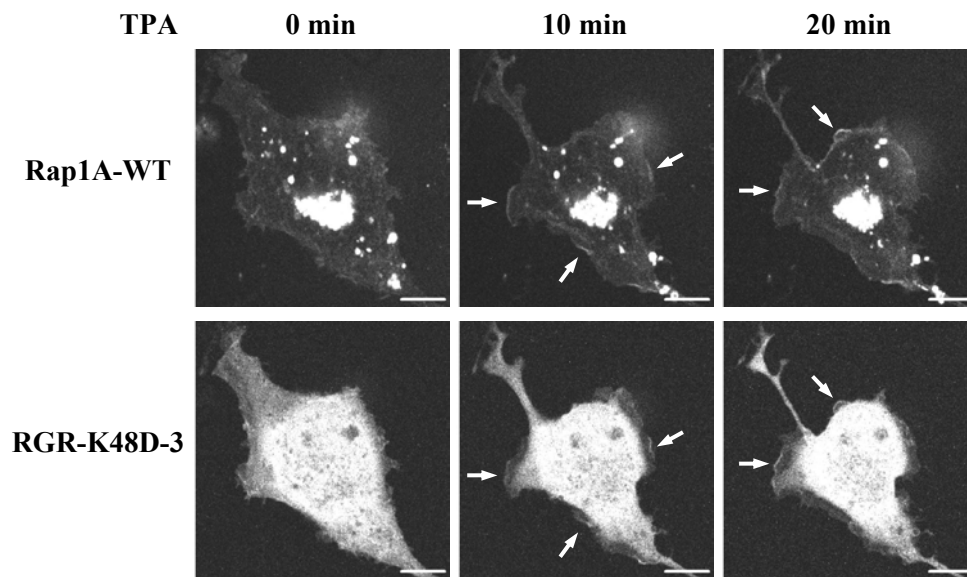


Abb. 5.20 TPA-induzierte Rap-Aktivierung ist verbunden mit der Translokation von Rap zur Plasmamembran

Cos-7 Zellen wurden mit DsRed-Rap1A-WT und GFP-RGR-K48D-3 transient transfiziert. 48 h nach Transfektion, inklusive 24 h Hungern in serumfreiem Medium, wurden die Zellen mit 1 μ M TPA stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten im LSM aufgenommen. Pfeile zeigen Bereiche der Plasmamembran zu denen Rap1 zusammen mit RGR-K48D-3 rekrutiert wird. Der weiße Balken entspricht 10 μ M.

6. Diskussion

Die Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle erfolgt mittels miteinander vernetzter Kaskaden von Protein-Protein – oder Protein-*Second-Messenger* – Interaktionen und Proteinmodifizierungen. Dies findet allerdings nicht homogen in der Zelle verteilt statt, vielmehr ist die Kompartimentalisierung der einzelnen Prozesse von entscheidender Bedeutung für den korrekten Ablauf der Signaltransduktion. Für viele Signalproteine sind verschiedene vorgeschaltete Signalmoleküle bekannt, durch die sie potentiell reguliert werden können. Gleichzeitig besitzen sie verschiedene Möglichkeiten zur Signalweitergabe an nachgeschaltete Proteine. Aber erst das Vorhandensein potentieller Interaktionspartner entscheidet darüber, welche der möglichen Signaltransduktionsprozesse im Einzelfall wirklich ablaufen. Das Vorhandensein der Interaktionspartner wird dabei nicht nur über deren Expression sondern vor allem auch über deren subzelluläre Lokalisation reguliert. In diesem Zusammenhang gewinnt die räumlich-zeitliche Auflösung von Signaltransduktionsprozessen zunehmend an Bedeutung. Ein wichtiges Werkzeug ist dabei die konfokale Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit fluoreszenten Reportersonden. Dies ermöglicht die Verfolgung von zellulären Ereignissen in Echtzeit innerhalb lebender Zellen.

In dieser Arbeit wurde eine fluoreszente Reportersonde designt, die Rap selektiv in seiner aktiven GTP-beladenen Konformation erkennt. Als Ausgangspunkt dafür diente die Rap-GTP – spezifische Ras/Rap-Bindedomäne von RalGDS (RalGDS-RBD oder RGR). Die Strategie zur Entwicklung der Reportersonde war zum einen die Effizienz der Rap-GTP – Detektion durch Oligomerisierung von RGR zu steigern und zum anderen durch RGR-Mutation die Eigenschaften der Reportersonde genau auf deren Verwendung *in vivo* abzustimmen. Als erstes wurde daher ein Set von RGR-Mutanten mit unterschiedlichen Affinitäten zu Rap generiert.

6.1 Veränderte Bindungseigenschaften durch RGR-Mutation

Es existiert keine Struktur des Komplexes zwischen Rap und der RalGDS-RBD. Aussagen über die molekularen Grundlagen dieser Bindung können aber aus der Kristallstruktur von Rap1 im Komplex mit der Raf-RBD und der NMR-Struktur des Komplexes zwischen Ras und der RalGDS-RBD abgeleitet werden (Geyer, 1997). Die beiden eng verwandten GTPasen Ras und Rap sind in ihrer Sequenzen zu 50 % identisch, und in der hauptsächlich für die Bindung verantwortlichen Kerneffektorregion (aa 32-40) sogar zu 100 %. Die Ähnlichkeit zwischen der Raf-RBD und der RalGDS-RBD zeigt sich vor allem in der räumlichen Struktur. Beide liegen in einer so genannten Ubiquitin α/β -Rolle vor. Vergleicht man die elektrostatischen Oberflächen beider Proteine, so fallen vier positiv geladene Aminosäuren an äquivalenten Positionen auf (R16, K28, K48, H49 in RalGDS-RBD und R67, K84, K87, R89

in Raf-RBD) (Geyer, 1997). Mutationen in Raf-RBD R67, K84 und R89 führen in unterschiedlichem Ausmaß zur Reduktion der Affinität gegenüber Ras und der Fähigkeit zur Vermittlung der RasG12V-induzierten Signaltransduktion (Block, 1996). Demzufolge könnte auch die Mutation der äquivalenten Aminosäuren in RalGDS-RBD (R16, K28, K48, H49) in einer schwächeren Bindung an Rap und Ras resultieren. Auch Lysin 44 der RalGDS-RBD ist möglicherweise an der Bindung zu Rap beteiligt. Der Vergleich zwischen freier RalGDS-RBD und RalGDS-RBD im Komplex mit Ras zeigt Veränderungen im NMR-Signal, die auf eine Beteiligung an der Assoziation hindeuten. Die fünf ausgewählten positiv geladenen Reste wurden jeweils durch ungeladenes Alanin und durch negativ geladenes Aspartat ersetzt.

Um die Affinität der RGR-Mutanten gegenüber Rap1 abzuschätzen, wurden diese im GAP-Assay miteinander verglichen. Die einzelnen Mutationen führten zu stark unterschiedlichen Affinitäten, so dass für die Konstruktion einer Rap-GTP – Sonde ein Set an RGR-Mutanten zur Verfügung stand, das einen weiten Affinitätsbereich abdeckt. Dabei lassen sich die RGR-Mutanten in vier Gruppen aufteilen. Die K48A – Mutation ist ohne Einfluss auf die Rap-Bindung. Vier der Mutation (K44A, R16A, R16D und K44D) sind in ihrer Bindung an Rap abgeschwächt, binden aber immer noch stärker als die Raf-RBD (RBD-1), deren K_D -Wert sich verglichen mit RGR um etwa den Faktor 100 unterscheidet (1,2 μ M für RBD, 0,01 μ M für RGR) (Nassar, 1996). Eine noch stärkere Reduktion der Rap-Bindung wurde bei den RGR-Mutationen K48D, H49A und H49D beobachtet. Lysin28 scheint für die Bindung an Rap unverzichtbar zu sein. Mutationen dieser Aminosäure führen zum Verlust der Fähigkeit zur Rap-Bindung. Dies bedeutet nicht unbedingt, dass Lysin28 direkt an der Rap-Bindung beteiligt ist. Alternativ könnte Lysin28 auch für die Ausbildung einer stabilen bindungskompetenten Konformation nötig sein. In diesem Zusammenhang auffallend ist, dass der Anteil an mitaufgereinigten *E. coli* – Chaperonen (Hsp70 und DnaK) verglichen mit Präparationen anderer RGR-Mutanten relativ hoch ist. Der Bindung zwischen Rap und RGR liegt hauptsächlich die Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen Effektorregion von Rap und einer positiv geladenen Oberfläche an RGR zugrunde. Erwartungsgemäß hat daher in allen Fällen die Substitution der positiven geladenen Aminosäuren durch neutrales Alanin einen geringer Einfluss auf die Bindung als die Mutation zu negativ geladenem Aspartat. Der Wegfall der positiven Ladung an Position 48 verändert die Affinität zu Rap nicht. Diese ist aber sehr stark abgeschwächt, wenn sich an Position 48 eine negative Ladung befindet. An den Positionen 16, 44 und 49 ist das Vorhandensein einer positiv geladenen Aminosäure für die volle Bindungsfähigkeit von RGR nötig. Die Substitution durch Aspartat führt zu einer weiteren Abschwächung der Rap-Bindung.

6.2 Veränderte Bindungseigenschaften durch RGR-Oligomerisierung

Von RGR-WT und vier RGR-Mutanten (K44A, R16A, K48D und H49A) wurden Dimere und Trimere mit dem Ziel kloniert, durch das Anbieten von mehreren Bindestellen auf einem Protein, die Bindung an Rap zu verstärken. Es wäre zu erwarten, dass nach Dissoziation eines Rap-Moleküls von einem der RGR-Module eines Trimers die Wahrscheinlichkeit der Reassoziierung mit dem gleichem Trimer durch die räumlich Nähe zu drei potentiellen Bindestellen erhöht ist. Entgegen den Erwartungen verhalten sich drei einzelne Bindedomänen im GAP-Assay genauso wie drei zu einem Trimer fusionierte Bindedomänen. Alle drei Bindestellen des Trimers sind demnach für Rap zugänglich, eine zusätzlich Verstärkung Bindung bleibt aber aus. Im Kontrast dazu zeigt ein Trimer der Raf-RBD im GAP-Assay bei gleicher Konzentration an Bindestellen eine deutlich stärkere Bindung an Ras als das entsprechende Monomer. Die Ursache für die unterschiedlichen Auswirkungen der Oligomerisierung ist bei den trimeren Bindedomänen und nicht bei Rap bzw. Ras zu suchen. Eine verstärkte Bindung durch Oligomerisierung wird auch bei der Assoziation von RBD-3 an Rap, aber nicht bei der Assoziation von RGR-WT-3 an Ras, beobachtet. Ein Unterschied zwischen RGR-WT-3 und RBD-WT-3 ist die Sequenz der *Linker* aus fünf Aminosäuren, die die einzelnen Bindedomänen miteinander verbinden. Die Bindung von RGR an Rap und Ras zeichnet sich durch einen hohen Enthalpiebeitrag und einem negativen Entropieterm aus. Anders die hauptsächlich Entropie getriebene Ras / Rap – Bindung von RBD, für die ein kleiner Enthalpiebeitrag und ein positiver Entropieterm charakteristisch sind. Trotz gleicher Effektorregionen in Ras und Rap unterscheidet sich also die Natur der RGR- und RBD-Bindung grundlegend von einander (Herrmann, 2003). Hierin könnte auch die Ursache für die unterschiedlichen Auswirkungen der Oligomerisierung liegen. Wie sich aber genau die Enthalpie und Entropie der Ras / Rap – Bindung durch die Oligomerisierung ändert, lässt sich nicht vorhersagen. Mittels Isothermaler Kalorimetrie (ITC) wurden die thermodynamischen Parameter der Bindung von RBD-1, RBD-2 und RBD-3 an H-Ras-G12V bestimmt. Dies bestätigte, dass mit steigendem Oligomerisierungsgrad die Stärke der Bindung (K_a) zunimmt. Dem zugrunde liegt eine Erhöhung der Enthalpie. Interessanterweise zeigten die ITC-Messungen auch eine 1:1 Stöchiometrie der Ras-Bindung für alle drei Oligomere (Augsten, 2005). RBD-3 bindet demnach immer nur ein Ras-Molekül. Diesem stehen also drei Bindestellen für eine mögliche Reassoziierung zur Verfügung. Es ist möglich, dass RGR im Gegensatz zu RBD in der Lage ist, drei Rap-Moleküle gleichzeitig zu binden. Einem dissoziierten Rap-Molekül würden dann keine zusätzlichen Bindestellen zur Reassoziierung zur Verfügung stehen. Dies könnte erklären, warum im GAP-Assay keine verstärkte Rap-Bindung nach RGR-Oligomerisierung beobachtet wurde. Das relativ hohe Rap / RGR – Verhältnis im GAP-Assay macht die Bindung mehrerer Rap-Moleküle an ein Trimer, wenn prinzipiell möglich, wahrscheinlich. GAP-Assays mit niedrigem Rap / RGR –Verhältnis

lieferten keine verlässlichen Aussagen. Es ist also möglich, dass der Effekt der Oligomerisierung auf die Rap-Bindung erst bei niedrigem Rap / RGR –Verhältnis deutlich wird und im GAP-Assay nicht dargestellt werden kann. Bei dem späterem Einsatz als Reportersonde *in vivo* ist ein sehr niedriges Verhältnis von endogenem Rap-GTP zu überexprimierter Bindedomäne zu erwarten. Wenn, wie eigentlich zu erwarten, die Oligomerisierung die Rap-Bindung verstärkt, sollte dies unter *in vivo* – Bedingungen zum tragen kommen.

6.3 Subzelluläre Lokalisation von Rap1

In Cos-7 Zellen ist DsRed1-markiertes Rap1A hauptsächlich an Endomembranen und nur zu geringem Teil an der Plasmamembran zu finden. Rap-enthaltende Vesikel konzentrieren sich im perinukleären Bereich und sind in manchen Zellen auch über das gesamte Cytoplasma verteilt. Häufig beobachtet man Rap auch in einer nicht vesikulären kompakten Struktur nahe dem Zellkern. Vesikuläres Rap kolokalisiert mit EEA-1, einem für frühe Endosomen typischen Protein. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der kürzlich für GFP-Rap1A beschriebenen subzellulären Verteilung in Cos-1 Zellen (Bivona, 2004). Auch frühere immunocytochemische Arbeiten zeigen Rap in Endosomen (Pizon, 1994). Eine bessere Auflösung endosomaler Strukturen gelang in der vorliegenden Arbeit mit der FYVE-Domäne von SARA, welche das in Membranen früher Endosomen angereicherte Phospholipid PI(3)P erkennt (Hayakawa, 2004). Rap kolokalisiert nur teilweise mit diesem Marker. Vesikel mit geringerer Rap-Expression sind Endosomen, während stark exprimierende Vesikel nicht durch SARA-FYVE erkannt werden. Dies könnten Endosomen späterer Stadien oder exocytotische Vesikel sein. So ist Rap zum Beispiel in Neutrophilen und Blutplättchen an exocytotische Granula assoziiert (Maridonneau-Parini, 1992; Nagata, 1995). Ob die perinukleäre Lokalisation sich ausschließlich auf endosomale Membranen beschränkt, oder ob Rap sich auch im Golgi befindet ist nicht eindeutig geklärt. Die Kolokalisation von Rap mit Golgi-Markern ist beschrieben worden (Beranger, 1991; Nomura, 2004). Allerdings wurde in keiner der beiden Studien die Möglichkeit berücksichtigt, dass sich im perinukleären Bereich außer dem Golgi-Apparat auch endosomale Strukturen befinden. Bei geringer mikroskopischer Auflösung der perinukleären Strukturen ist die endosomale Lokalisation von Rap nicht von einer möglichen Lokalisation im Golgi zu unterscheiden. In den hier untersuchten Cos-7 Zellen, wurde eine partielle Überlappung der Rap-Expression mit einem Golgi-Markern beobachtet. Im Bereich der Kolokalisation werden durch beide Proteine identische Strukturen gefärbt, was es unwahrscheinlich macht, dass es sich hierbei um Rap an benachbartem Endosomen-Kompartiment handelt. Häufig ist Rap nicht im zentralen Bereich des Golgis lokalisiert sondern in dem umliegenden Bereich. Ein Muster, das an die Struktur von Cis- und Trans- Golgi erinnert. Zur endgültigen Klärung ob Rap im Golgi lokalisiert ist,

sind weitergehende Untersuchungen mit Markerproteinen, deren genaue Verteilung in den einzelnen Golgi-Kompartimenten bekannt ist, nötig. Bivona et. al schließen die Assoziation von Rap an Golgi-Membranen aus. Dies leiten sie unter anderem aus der Tatsache ab, dass der Golgi-Marker nur mit einem Teil des perinukleärem Rap kolokalisiert. Aussagekräftiger sind die Ergebnisse der Fraktionierung subzellulärer Membranen. Diese zeigen Rap in Endosomen und der Plasmamembran. Die Fraktion mit angereicherten Golgi-Membranen zeigt nur wenig Rap, was auf Verunreinigung durch Teile der Plasmamembran zurückgeführt wird. Leider verliert das Experiment aufgrund eines fehlenden Golgi-Markers an endgültiger Überzeugungskraft (Bivona, 2004).

6.4 RGR-WT-3 als Rap-GTP – Reportersonde

Im GAP-Assay wurde der Einfluss der RGR-Oligomerisierung auf die Rap-Bindung nicht deutlich. Anders bei der Rekrutierung zu koexprimiertem Rap1A-G12V in Cos-7 Zellen. Die Effizienz der Translokation zu Rap nimmt mit steigendem Oligomerisierungsgrad der RGR-Oligomere, die sich bei alleiniger Expression gleichmäßig im Cytoplasma verteilen, zu. Dabei ist der Unterschied zwischen RGR-WT-2 und RGR-WT-3 nur gering. Das Monomer RGR-WT-1 dagegen detektiert Rap1A-G12V nur in einem Teil der untersuchten Zellen und dies auch mit deutlich geringerer Effizienz. Das Potential von oligovalenten Reportersonden ist anhand von Src-SH2-Domänen gezeigt worden. Diese wurden genutzt um Fokale Adhäsionsstellen aufgrund typischer Phosphorylierungen zu visualisieren. Eine nachweisbare Rekrutierung der YFP-markierten Src-SH2-Domäne zu Fokalen Adhäsions-stellen findet dabei nur statt, wenn diese als Dimer vorliegt (Kirchner, 2003).

Die Translokation von RGR-WT-3 zu GTP-beladenem Rap beruht auf deren Assoziation an Rap. RGR-WT-3 erkennt Rap auch, wenn sich dieses im Cytoplasma befindet. Dagegen bleibt die Rekrutierung zu Rap1A-G12V/D38K, einer Rap-Mutante mit gestörter Effektorbindung, aus. Rap1A-S17N wird häufig als dominant negative Mutante verwendet. Entsprechende Kontrollen waren hier nicht möglich, da aus ungeklärtem Grund trotz der im Western Blot nachweisbaren Expression von DsRed1-Rap1A-S17N in Cos-7 Zellen keine Fluoreszenz beobachtet wurde. Um auszuschließen, dass dies durch Fehler im verwendeten Expressionsplasmid zustande kommt, wurde Rap1A-S17N pDsRed1-C1 mit anderer Strategie erneut kloniert. Als Ausgangsplasmid diente diesmal Rap1A-WT pDsRed1-C1, von dem ein intaktes und fluoreszierendes Protein exprimiert wird. Die Einführung der S17N – Mutation führt zur Expression eines nicht fluoreszierenden Proteins. Alternativ wurde RGR-WT-3 mit unmarkiertem Rap1A-G12V oder Rap1A-S17N kotransfiziert. Derartige methodische Ansätze sind zwar mehrfach publiziert, haben aber den Nachteil, dass vor allem beim Ausbleiben einer Rekrutierung nie sicher ist, dass die beobachtete Zelle wirklich beide

Proteine exprimiert (Bivona, 2004; Chiu, 2002). Im Gegensatz zu unmarkiertem Rap1A-1AV12 kann unmarkiertes Rap1A-S17N RGR-WT-3 nicht rekrutieren (nicht gezeigt).

RGR-WT-3 erkennt auch die konstitutiv aktiven Varianten der beiden Rap-Isoformen 2A und 2B. Rap2 findet man hauptsächlich im perinukleärem Bereich, aber auch an der Plasmamembran. Im Gegensatz zu Rap1 wurde Rap2 nur selten in Vesikeln beobachtet. Auch in BHK Zellen ist Rap2A nicht in Endosomen, sondern nur im Golgi-Apparat nachweisbar (Pizon, 1994).

Die Oligomerisierung von RGR-WT führt zwar zu einer wesentlichen Verbesserung der Rekrutierung zu Rap-GTP. Die Verwendung von RGR-WT-3 als Reportersonde birgt aber zwei entscheidende Nachteile in sich. Zum einem erkennt RGR-WT-3 auch Ras-GTP. Zum anderem ist die Assoziation an Rap-GTP stark genug um die Regulation durch GAPs zu verhindern, was in einer artifiziellen Verstärkung der beobachteten Rap-Aktivierung führt.

RGR-WT-3 kolokalisiert deutlich mit den konstitutiv GTP-beladenen Formen aller vier untersuchten Ras-Isoformen, während dominant negatives Ha-Ras-S17N nicht von RGR-WT-3 erkannt wird. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die Assoziation von RGR-WT-3 an Ras zurückzuführen. Zumindest für M-Ras-Q71L ist auch ein anderes Szenario möglich. Der Rap-Austauschfaktor RA-GEF-2 wird durch aktives M-Ras, aber nicht durch andere Ras-Isoformen, an die Plasmamembran rekrutiert und kann dort Rap1 aktivieren (Gao, 2001). Ein indirekter Beweis dafür, dass RGR-WT-3 an aktives Ha-Ras bindet, ist, dass RGR-WT-3 die Ha-Ras-G12V induzierte Erk-Phosphorylierung stark abschwächt. Die Stärke der Bindung zeigt sich darin, dass die Repression der Erk-Phosphorylierung durch RGR-WT-3 mindestens mit gleichem Ausmaß erfolgt wie die Inhibierung durch RBD-3. Auch die Assoziation von monomerer RGR-WT-1 ist stark genug, um die Ras-induzierte Signaltransduktion einzuschränken. Kolokalisationsstudien zeigen ebenfalls eine überraschend deutliche Rekrutierung von RGR-WT-1 zu Ha-Ras-G12V. Dieses wird wesentlich besser erkannt als aktives Rap. Die geringere Expression von Rap, verglichen mit der von Ras, könnte dies zwar teilweise, aber sicher nicht vollständig, erklären. Diese Beobachtungen stehen in klarem Widerspruch zu einer Arbeit in der GFP-RGR als Rap-spezifische Sonde verwendet wurde (Bivona, 2004). Einziger Unterschied zur vorliegenden Arbeit ist, dass als konstitutiv aktive Form Ha-Ras-Q61L verwendet wurde. Trotz allem ist es wahrscheinlich, dass die von Bivona et al. beobachtete Translokalisierung von GFP-RGR auf der Aktivierung von Rap beruht, da Rap hier überexprimiert wurde und demnach der potentielle Einfluss von endogenem Ras-GTP gering sein sollte.

In ruhenden Zellen durchläuft Rap1 einen ständigen Zyklus an Aktivierung und Deaktivierung. Dabei ist das Gleichgewicht zwischen basaler GAP- und GEF- Aktivität so eingestellt, dass das Rap1-GTP / GDP – Verhältnis auf einem niedrigen *steady-state*-Level gehalten wird. Wird dieses Gleichgewicht durch Blockade der GAP-Aktivität gestört, kann daher Rap-GTP akkumulieren. Rap-GAPs und RGR konkurrieren um die Bindung an Rap-GTP. Dies ist offensichtlich auch bei Koexpression von RGR-WT-3 mit wildtypischem Rap der Fall. Beide kolokalisieren deutlich miteinander. Eine derart hohe basale Rap-Aktivität in serum-gehungerten Zellen ist unerwartet. Die Rekrutierung von RGR-WT-3 spiegelt daher höchstwahrscheinlich nicht die physiologische Situation wieder, sondern zeigt vielmehr, dass RGR-WT-3 Rap der Regulation durch GAPs entzieht. In seltenen Fällen wurde dies auch bei alleiniger Expression von RGR-WT-3 also mit endogenem Rap beobachtet.

GST-RGR Pull Downs bestätigen die RGR-WT-3 induzierte Rap-Aktivierung. Allein die Expression der Bindedomäne ist ausreichend um eine massive Akkumulation sowohl von endogenem als auch von überexprimiertem Rap-GTP hervorzurufen. Eine Eigenschaft die RGR-WT-3 für die Verwendung als Reportersonde ungeeignet macht. Zwei Schlüsse können allerdings aus den obigen Daten gezogen werden. Erstens, erlaubt die subzelluläre Verteilung der Bindedomäne auch den Zugang zu endogenem Rap. Zweitens, wird der basale GTP / GDP – Zyklus offensichtlich sowohl an Endomembranen als auch an der Plasmamembran durchlaufen. Die nötige Maschinerie zur stimulationsabhängigen Rap-Aktivierung ist demnach vorhanden. Nicht auszuschließen ist natürlich auch, dass die GTP-Beladung von Rap nicht direkt an der Plasmamembran geschieht, sondern Rap bereits aktiv nach GTP-Beladung an Endomembranen zur Plasmamembran transloziert wird.

6.5 RGR-K48D-3 als Rap-GTP – Reportersonde

Auf der Suche nach einem Rap-GTP – Reporter, der die verstärkte Rekrutierung einer multivalenten Sonde aufweist, gleichzeitig aber auch Rap-spezifisch und nicht inhibierend auf die GAP-Aktivität ist, wurden vier trimere RGR-Mutanten getestet. Alle RGR-Trimere sind in der Lage zu Rap1A-G12V zu translozieren. Dagegen werden nur drei davon durch Ha-Ras-G12V rekrutiert. RGR-K48D-3 kolokalisiert weder mit aktivem Ha-Ras noch inhibiert es die Ras induzierte Erk-Phosphorylierung. Auch konstitutiv aktive Mutanten anderer Ras-Isoformen (K-Ras, M-Ras) werden nicht erkannt. Die Affinität der Bindung von monomerer RGR an TC21 ist noch geringer als die an Ha-Ras (Herrmann, 2003). Trotzdem wurde eine wenn auch nur sehr schwache Kolokalisation von RGR-K48D-3 mit aktivem TC21 beobachtet.

Die Affinität von RGR-K48D zu Rap ist verglichen mit RGR-WT stark abgeschwächt. Dass RGR-K48D-3 sehr gut Rap-GTP *in vivo* detektieren kann, obwohl monomere RGR-K48D-1 nicht durch Rap1A-G12V rekrutiert wird, unterstreicht einmal mehr das Potential von multivalenten Reportersonden. Dafür, dass RGR-K48D-3 als einzige der getesteten Mutanten nicht an Ras-GTP bindet, gibt es drei mögliche Gründe.

Erstens ist RGR-K48D die Mutante mit der schwächsten Rap-Bindung. Im gleichen Maße könnte auch die Bindung an Ras reduziert sein und dabei ein Niveau erreichen, dass für eine Rekrutierung *in vivo* nicht mehr ausreicht.

Zweitens könnte Lysin48 von größerer Bedeutung für die Bindung von Ras als für die Bindung von Rap sein. Dass Mutationen der Bindedomäne die Ras- und Rap- Bindung unterschiedlich beeinflussen können, ist zumindest für c-Raf-1 – RBD gezeigt (Nassar, 1996). Drittens könnte weniger die Position sondern vielmehr die Art der Mutation für das Ausbleiben der Ras-Bindung verantwortlich sein. RGR-K48D-3 unterscheidet sich von den anderen verwendeten Trimeren auch dadurch, dass hier die ursprüngliche positive Ladung durch eine negativ geladene Aminosäure ersetzt wurde. Möglicherweise stört diese mehr die Assoziation an Ras als die an Rap. Es ist also vorstellbar, dass eine der nicht als Trimer getesteten Aspartat-Mutanten, die Rap stärker als RGR-K48D binden, ebenfalls kein Ras-GTP erkennt und somit womöglich eine bessere Rap-GTP – Sonde ist als RGR-K48D-3. Zur Klärung dieser Frage müssten RGR-K48A-3 und die entsprechenden Aspartat-Mutanten der Ras-bindenden Trimere getestet werden. Aufgrund des damit verbunden erheblichen Klonierungsaufwandes und der Tatsache, dass RGR-K48D-3 sehr gut als Rap-GTP – Reportersonde verwendet werden kann, wurde davon abgesehen.

Der zweite große Nachteil von RGR-WT-3, neben der mangelnden Spezifität, ist die Inhibierung der endogenen GAP-Aktivität. Auch in diesem Punkt ist RGR-K48D-3 besser als Reportersonde geeignet. GST-RGR – Pull Downs zeigen nur eine leichte Rap-Aktivierung durch Expression der Bindedomäne, die verglichen mit RGR-WT-3 stark abgeschwächt ist. Dies bestätigt indirekt auch, dass RGR-K48D-3 an Rap binden kann. Eine leichte Verstärkung der Rap-Aktivierung aufgrund verzögerter GAP-Aktivität verbunden mit einer verlängerten Translokalisierung, kann für den Einsatz als Reportersonde sogar von nutzen sein. Nachteilig wird dies erst, wenn dadurch der endogene Verlauf der Rap-Aktivierung zu stark verzerrt wird. Kolo-kalisation von RGR-K48D-3 mit Rap1A-WT in Serum-gehungerten Zellen bleibt, im Gegensatz zu RGR-WT-3, in den meisten Zellen aus. Interessanterweise kommt es dabei nicht zu einer in allen Zellen gleichmäßig abgeschwächten Rekrutierung. Vielmehr scheint dass jeweilige Verhältnis von exprimierter Bindedomäne zu endogener GAP-Aktivität darüber zu entscheiden, ob Rap-GTP akkumuliert oder nicht. In dem kleinen Teil an Zellen, in denen RGR-K48D-3 überwiegt, kommt es dann zu einer Kolo-kalisation mit Rap1A-WT,

die im Ausmaß mit der für RGR-WT-3 typischen Kolo-kalisation vergleichbar ist. Ob die Rap-Aktivierung in allen Zellen gleichmäßig gering oder aber auf wenige Zellen beschränkt ist, lässt sich im GST-RGR Pull Down nicht erkennen. Ein Beispiel dafür, wie wichtig es sein kann, Untersuchungen an Zellpopulationen durch Beobachtungen von Einzelzellen zu komplementieren.

Wenn RGR-WT-3 und in deutlich geringerem Maße auch RGR-K48D-3 die Bindung von Rap-GAPs an Rap verhindern, ist es wahrscheinlich, dass auch die Assoziation mit Effektoren und somit die Signalweiterleitung beeinträchtigt wird. Tatsächlich wurde monomere RGR mehrfach als Negativkontrolle zur Inhibierung Rap-vermittelter Effekte eingesetzt (de Bruyn, 2002; Price, 2004; Reedquist, 2000). Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch RGR-WT-3 die Rap-Signaltransduktion deutlich, wenn nicht gar vollständig blockiert. Das Ausmaß eines möglichen inhibitorischen Einflusses von RGR-K48D-3 sollte am Beispiel der Integrin-vermittelten Adhäsion untersucht werden. Aufgrund sehr geringer Transfektionsraten der verwendeten Jurkat T-Zellen ist dies nicht gelungen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass RGR-K48D-3 die Rap-Signaltransduktion behindert. Dies könnte einerseits die Stärke und Dauer der beobachteten Rap-Aktivierung positiv oder negativ beeinflussen, andererseits könnte eine nachgeschaltete Rap-Aktivierung an anderer subzellulärer Lokalisation verhindert werden. So kann zum Beispiel RA-GEF-1 durch Rap-GTP rekrutiert werden, und so die initiale Rap-Aktivierung verstärken. (Liao, 2001). Auch Rac und PLC ϵ befinden sich in Signalwegen sowohl vor als auch nach Rap, können also positive Feedback-Schleifen bilden.

6.6 TPA-induzierte endogene Rap Aktivierung

RGR-K48D-3 kann die TPA-vermittelte Aktivierung von endogenem Rap in Cos-7 Zellen nachweisen. Von den getesteten Stimuli (EGF, Endothelin und Forskolin + IBMX + 8-Br-cAMP) führte die Behandlung mit TPA zur stärksten Rap-GTP – Akkumulation. RGR-K48D-3 zeigt die Aktivierung von Rap ausschließlich an der Plasmamembran. Dabei wurden drei unterschiedliche Muster der Rap-Aktivierung beobachtet. Dies sind erstens eine scharf abgegrenzte Rap-GTP Akkumulation direkt am Zellrand im Zusammenhang mit *Membrane Ruffles*, zweitens die Aktivierung in einem breiteren Bereich an der Plasmamembran während der Lamellipodienbildung und drittens die Rap-Aktivierung bei der Entstehung von großen Vesikeln. Die einzelnen Muster unterscheiden sich dabei in ihrer Häufigkeit und in ihrem zeitlichen Verlauf.

Rap-Aktivität an Membrane Ruffles wurde auch nach EGF-Stimulation von Cos-1 Zellen nachgewiesen (Bivona, 2004). Dabei stimmt auch die Kinetik der Rap-Aktivierung (Maximum nach 5-10 min) mit der hier gezeigten TPA-induzierten Aktivierung sehr gut überein. Für mindestens zwei Rap-GEFs ist die induzierbare Translokation an die Plasmamembran von Cos Zellen beschrieben. RasGRP-2 wird in Anwesenheit von konstitutiv aktiven Formen von Vav, einem Rho/Rac-GEF, und Rac zu *Membrane Ruffles* rekrutiert. Dem liegt eine direkte Bindung an F-Aktin zugrunde. Durch Verwendung von Raichu-Rap (siehe 2.4) als Reportersonde konnte gezeigt werden, dass überexprimiertes RasGRP2 Rap im Cytosol aktivieren kann. Für die Akkumulation von Rap-GTP an der Plasmamembran allerdings ist die Koexpression von Vav nötig. Gleiches wird auch durch alleinige Expression von Vav erreicht. Demnach führt Vav-induziertes *Membrane Ruffling* zur Bindung von endogenem RasGRP2 an F-Aktin, gefolgt von der Aktivierung von Rap an der Plasmamembran (Caloca, 2004). Ein weiterer Rap-GEF, RA-GEF-2, wird durch aktiviertes M-Ras an die Plasmamembran rekrutiert und kann dort Rap aktivieren (Gao, 2001). In beiden Fällen gibt es keine Hinweise darauf, dass durch die Plasmamembran-rekrutierung der Rap-GEFs deren Aktivität gegenüber Rap geändert wird. Ein weiteres Indiz für eine Rap-Aktivierung in Membran Ruffles ist die induzierbare Translokation des Rap-Aktivatoren PLC- γ 1 zu Membran Ruffles (Barker, 1998). Auch das Rap1-Homolog in *Dictyostelium discoideum* reguliert aktin-abhängige Prozesse wie *Membrane Ruffling* und die Ausbildung von Lamellipodien (Rebstein, 1997).

Einige Cos-7 Zellen reagieren auf TPA mit der Ausbildung von großflächigen Lamellipodien. Die Ausbreitung von Zellen ist ein komplexer Prozess, der auch die initiale Bindung von Integrinen an die extrazelluläre Matrix beinhaltet. Diese Adhäsion wird bekannterweise durch Rap reguliert. Es überrascht daher nicht, dass RGR-K48D-3 an der Front von Lamellipodien die Aktivierung von Rap anzeigt. Dabei akkumuliert RGR-K48D-3 nicht wie bei *Membrane Ruffles* in einem scharf abgegrenzten Bereich direkt am Zellrand, sondern ist verstärkt in einem diffuseren Bereich dahinter zu finden. Gleiches wurde auch für die Rac-Aktivierung, dargestellt via Raichu-Rac, beschrieben (Itoh, 2002). Rac ist ein zentraler Regulator der den Lamellipodien zugrunde liegenden F-Aktin – Strukturen (Takai, 2001). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Rap an der Regulation einiger, aber nicht aller, Rac-GEFs und damit an der Ausbreitung von HeLa-Zellen auf Fibronectin, beteiligt ist. Vav2 und Tiam1 binden an Rap1-GTP und benötigen dies um die Ausbreitung von Zellen auf der extrazellulären Matrix zu induzieren. Die Rap1-abhängige Rac-Aktivierung, beruht hierbei nicht auf einer Erhöhung der GEF-Aktivität, sondern auf der Rekrutierung von Vav2 zu Pseudopodien, über die die Zelle an Fibronectin adheriert ist. Membranfraktionierungen ergaben, dass in Pseudopodien sowohl Rap1 als auch Vav2 konzentriert sind. Während Rap1 sich auch in Anwesenheit von

Rap1GAP, also in GDP-beladener Form, in Pseudopodien befindet, wird für die Anreicherung von Vav2 aktives Rap benötigt (Arthur, 2004). Interessanterweise ist nicht nur Rap für die korrekte Lokalisation von Rac-GEFs, sondern, wie bereits beschrieben, auch andersherum Rac für die Membranrekrutierung von Rap-GEFs verantwortlich. Demnach scheinen Rac und Rap kooperativ bei der Ausbildung von Lamellipodien und *Membrane Ruffles* zusammenzuarbeiten. Einiges deutet daraufhin, dass die Regulation von GEFs der Rho-GTPasen ein häufiges Prinzip zur Vermittlung Rap-abhängiger Prozesse ist. Die Assoziation an Rap-GTP erfolgt über die katalytische DH (*Dbl homology*)- und die PH- Domäne von Vav2. Derzeit sind über 60 Rho-GEFs der Dbl-Familie bekannt. Unter denen wurden bereits einige nicht näher beschriebene Cdc42- und RhoA- spezifische Austauschfaktoren identifiziert, die ebenfalls an Rap1 binden (Arthur, 2004). Nectine sind Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, welche Cdc42-vermittelt die Ausbildung von *Adherens Junctions* unterstützen. Auch daran ist Rap1 beteiligt, welches zusammen mit c-Src für die Aktivierung des Cdc42-GEFs FRG verantwortlich ist. Allerdings ist hier Rap1 nur für die Aktivierung aber nicht für die Rekrutierung von FRG nötig (Fukuyama, 2004).

Ein anderer erst kürzlich identifizierter Rap-Effektor bietet eine weitere Möglichkeit für Rap1, Einfluss auf die Ausbildung von Lamellipodien zu nehmen. Das Adaptorprotein RIAM interagiert neben Rap-GTP auch mit dem aktinbindendem Profilin. Überexpression von RIAM führt zur Bildung von Lamellipodien und zur Zellausbreitung (Lafuente, 2004).

Hohe Rap-Aktivität wurde auch bei der Entstehung großer Vesikel in der Zellperipherie beobachtet. Diese schnüren sich höchstwahrscheinlich von der Plasmamembran ab. Aufgrund der geringen Zelldicke in der Peripherie der Zelle, liegt die Oberfläche der Zelle in der Regel kurz oberhalb oder in dem beobachteten optischen Schnitt. Was dazu führt, dass an der Plasmamembran gebildete Vesikel im Cytoplasma nahe dem Zellrand erscheinen. Die Größe der Vesikel (1,5-3 μm) macht es wahrscheinlich, dass es sich dabei um Makropinosomen handelt. Makropinocytose ist ein Prozess der eng mit der Bildung von Lamellipodien und *Membrane Ruffling* verbunden ist. Dabei falten sich dorsale *Ruffles* um und schließen so extrazelluläres Medium ein. Transiente Makropinocytose wird in vielen Zelltypen durch Wachstumsfaktoren (Amyere, 2000) oder Phorbolster (Swanson, 1989) hervorgerufen. Auch Makropinocytose ist aktinabhängig und wird durch Rac und dessen Effektor PAK reguliert. Aktives Rac wird durch Makropinosomen internalisiert, was womöglich zur Deaktivierung von Rac nötig ist. Inhibition von Makropinocytose durch dominant negatives Dynamin2, eine GTPase, welche die Abschnürung von Vesikeln vermittelt, resultiert in der Akkumulation von aktivem Rac in dorsalen *Ruffles*, und dem Ausbleiben von Zellausbreitung und Lamellipodien, welche ein kontinuierliches Recycling der Plasmamembran und darin enthaltener Signalmoleküle via Makropinocytose erfordern (Schlunck, 2004). Das bereits

diskutierte Zusammenspiel zwischen Rac und Rap macht es denkbar, dass auch aktives Rap durch Makropinocytose internalisiert wird. Die Aktivität von PLC ϵ ist zusammen mit PI3K für die Entstehung der Makropinosomen erforderlich (Amyere, 2000). PLC ϵ bindet GTP-abhängig an Rap1 und kolokalisiert mit konstitutiv aktivem Rap1 (Song, 2001). Dies legt die Spekulation nahe, dass Rap-GTP PLC ϵ rekrutiert und so seine eigene Internalisierung sowie die von Rac und womöglich anderer Signalmoleküle unterstützt. PLC ϵ - und PI3K-abhängige Makropinocytose wird durch Expression von Ras in Fibroblasten hervorgerufen (Amyere, 2000). In Übereinstimmung damit wurde auch in TPA stimulierten Cos-7 Zellen mit einer trivalenten RBD-basierten Reportersonde die Aktivierung von Ras an entstehenden mutmaßlichen Makropinosomen beobachtet (nicht gezeigt).

6.7 RGR-K48D-3 Akkumulation korreliert mit Rap-Aktivierung

Eine mögliche Fehlerquelle bei Experimenten, die auf der Translokalisierung von Reportersonden beruhen, ist eine unspezifische Signalerhöhung, z.B. durch veränderte Zelldicke. Um zu zeigen, dass die Membranrekrutierung von RGR-K48D-3 nur auftritt, wenn auch Rap aktiviert wird, wurde die PDGF stimulierte Rap-Aktivierung als Kontrollsystem gewählt. In PAE-Zellen, die den PDGF-Rezeptor stabil exprimieren, wird RGR-K48D-3 nach PDGF Stimulation an die Plasmamembran rekrutiert. PDGFR-Y_{1009/1021}F, eine Rezeptormutante mit gestörter PLC γ -1 – Bindung, ist nicht mehr in der Lage Rap zu aktivieren (Zwartkruis, 1998). Dementsprechend reagieren PAE-Zellen, die PDGFR-Y_{1009/1021}F stabil exprimieren, auch nicht mehr mit einer RGR-K48D-3 - Akkumulation auf PDGF. Dies macht es unwahrscheinlich, dass der in PAE PDGFR β – Zellen beobachtete RGR-K48D-3 – Rekrutierung eine unspezifische Akkumulation zugrunde liegt.

6.8 Vorteile von RGR-K48D-3 gegenüber anderen Rap-GTP-Reportern

Wie schon in Cos-7 Zellen, beschränkt sich auch in PAE-Zellen die Rap-Aktivierung auf Plasmamembran – lokalisiertes Rap. Dies bestätigt zwei andere Arbeiten die Rap-GTP ebenfalls ausschließlich an der Plasmamembran detektieren konnten. In Thrombin stimulierten Megakaryocyten wurde dies mit GST-RGR und fluoreszenzmarkiertem anti-GST-Antikörper nachgewiesen (Balduini, 2004 und Abb. 2.2 B). Eine Methode, die auf fixierte Zellen beschränkt ist und möglicherweise nicht auf alle Zelltypen übertragen werden kann. So ist es zum Beispiel in Cos-1 Zellen nicht gelungen, Plasmamembran - lokalisiertes Rap in fixierten Zellen nachzuweisen. Vermutlich ist dieses sensitiv gegenüber Fixierung und Permeabilisierung der Zellen (Bivona, 2004). In EGF-stimulierten Cos-1 Zellen wurde die Rap-Aktivierung mit GFP-RGR als Reportersonde verfolgt. Dies geschah fast ausschließlich in Zellen die Rap1 überexprimierten, was offensichtlich für eine verlässliche

Translokalisierung von GFP-RGR nötig ist (Bivona, 2004). Bivona et al. zeigen auch eine Zelle, bei welcher anscheinend der Nachweis von endogenem Rap-GTP gelang. Die dabei beobachtete GFP-RGR-Rekrutierung ist allerdings unbefriedigend. Dies bestätigt die in der vorliegenden Arbeit gesammelten Erfahrungen mit RGR-WT-1, welches nur ineffizient und zum Teil auch gar nicht mit Rap1A-G12V kolokalisiert. Die Verbesserung der Leistungsfähigkeit von RGR als Reporter für endogenes Rap war Ziel der vorliegenden Arbeit und ist mit der trivalenten Sonde RGR-K48D-3 gelungen, wie der Vergleich von GFP-RGR (Bivona, 2004 und Abb. 2.2 C) mit RGR-K48D-3 (Abb. 5.17 und Abb. 5.19) deutlich macht.

Ein an sich eleganter Ansatz zum Nachweis endogener Rap-Aktivierung ist der FRET-basierte Reporter Raichu-Rap (siehe 2.4). Dieser scheint aber für den Nachweis der Rap-Aktivierung nur bedingt einsetzbar zu sein. Zum einem könnte dies an der häufig kritisierten Verwendung der C-terminalen Sequenz von K-Ras4B zur Membranverankerung liegen. Zum anderen ist womöglich auch die Annahme, dass dort wo Raichu-Rap eine hohe GEF-Aktivität detektiert auch endogenes Rap lokalisiert ist und aktiviert wird, nicht berechtigt. So wird zum Beispiel die Rap-Aktivierung durch RA-GEF-2 und RasGRP2 über deren Lokalisation und wahrscheinlich nicht über deren Aktivität reguliert (Caloca, 2004; Gao, 2001). Demnach könnten Rap-GEFs schon vor dem Zusammentreffen mit Rap aktiv sein und die lokale GAP-Aktivität überwiegen. In diesem Fall würde Raichu-Rap eine falschpositive Rap-Aktivierung indizieren. Raichu-Rap zeigt in EGF stimulierten Cos-1 Zellen ein anderes Muster der Rap-Aktivierung als oben beschrieben. Hier erfolgt die Aktivierung von Rap perinukleär und breitet sich von dort über die Zellen aus, findet aber nicht an der Plasmamembran statt (Mochizuki, 2001; Ohba, 2003). Zusätzlich erschwert wird die Interpretation durch eine geringe Auflösung der Aufnahmen, die eine Unterscheidung subzellulärer Strukturen unmöglich macht (Abb. 2.2 A).

6.9 Induzierbare Translokalisierung von Rap zur Plasmamembran

Rap1A-S17N, welches nicht zur GTP-Bindung fähig ist, befindet sich ausschließlich an Endomembranen, dagegen tritt Rap1A-G12V auch an der Plasmamembran auf. Die Lokalisation von Rap ist demnach abhängig von dessen Aktivierungszustand (Bivona, 2004). Diese Frage wurde in der vorliegenden Arbeit nicht direkt adressiert. Die mit der subzellulären Verteilung von Rap1A-WT und Rap1A-G12V gesammelten Erfahrungen bestätigen aber, dass letzteres häufiger und in stärkerem Ausmaß in der Plasmamembran von serum-gehungerten Cos-7 Zellen zu finden ist. Die Plasmamembranlokalisation von Rap kann auch extrazellulär stimuliert werden. Sowohl die EGF- als auch die Thrombin- induzierte Rap-Aktivierung ist verbunden mit der Translokalisierung von Rap aus dem Cytosol an die Plasmamembran (Balduini, 2004; Bivona, 2004). Dies ist auch bei der hier beschriebenen TPA-induzierten Rap-Aktivierung in Cos-7 Zellen der Fall. DsRed-markiertes Rap1A-WT

akkumuliert an der Plasmamembran und rekrutiert RGR-K48D-3, ist also GTP-beladen. Im Gegensatz zu Bivona et al., die Translokalisierung und Aktivierung getrennt detektieren, wurde hier erstmalig die Translokalisierung von Rap1 zusammen mit dessen Aktivierung innerhalb einer lebenden Zelle visualisiert.

Dass Rap auch im GDP-gebunden Zustand Plasmamembran-lokalisiert sein kann, darauf deuten Untersuchungen an HeLa Zellen, in denen Rap unabhängig vom Aktivierungszustand in Pseudopodien akkumuliert (Arthur, 2004). Auch beschränkt sich die Rap-GTP – Bildung wahrscheinlich nicht nur auf die Plasmamembran. In den hier verwendeten PAE Zellen wurde eine starke basale Aktivierung von Rap beobachtet. Gleichzeitig ist aber DsRed-Rap1A-WT nur schwach in der Plasmamembran exprimiert. Ektopisches Rap1A befindet sich hauptsächlich im perinukleären Bereich. Da RGR-K48D-3 auch bei alleiniger Expression in den meisten Zellen dort akkumuliert, ist hier offensichtlich das in ruhenden Zellen GTP-beladene Rap anzutreffen (siehe Abb. 5.18 und 5.19). Kollokalisationsstudien mit Golgi- und Endosomen- Markern, legen nahe, dass es sich dabei hauptsächlich um Golgi-lokalisiertes Rap handelt (nicht gezeigt).

6.10 Zukünftige Anwendungsmöglichkeiten für RGR-K48D-3

Mit RGR-K48D-3 wurde in dieser Arbeit eine Rap-GTP – spezifische Reportersonde entwickelt, mit der die Aktivierung von endogenem Rap in lebenden Zellen visualisiert werden kann. Das Potential der trivalenten Reportersonde als Werkzeug zur räumlich und zeitlich Auflösung der Rap-Aktivität wurde beispielhaft an zwei verschiedenen Zellsystemen gezeigt. Die vielfältigen Funktionen von Rap1 bieten eine Reihe weiterer interessanter Fragestellungen, deren Klärung mit RGR-K48D-3 möglich sein sollte.

Rap ist an der Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix- Kontakten beteiligt. Eine besondere Form von Zell-Zell-Kontakten ist die immunologische Synapse zwischen T-Zelle und Antigenpräsentierender Zelle. Dabei kommt es an der Kontaktstelle zur Akkumulation von TCRs, welche von einem Ring aus LFA-1 umgeben sind (Hogg, 2003). Dieses Integrin wird bekannterweise durch Rap1, welches ebenfalls in der Immunologischen Synapse konzentriert wird, reguliert (Katagiri, 2002). Ob und wie Rap hier aktiviert wird, ist bisher nicht untersucht worden. RGR-K48D-3 könnte zur Beantwortung dieser Frage dienen. Ähnliches gilt auch für E-Cadherin basierte Zell-Zell-Kontakte, an denen Rap1 ebenfalls akkumuliert. Dabei ist die Aktivität von Rap1 zwar für die korrekte Ausbildung der E-Cadherin-Kontakte nötig, die Rap1-Rekrutierung aber ist insensitiv gegenüber Rap1GAP-Expression (Hogan, 2004). Auch über den räumlich-zeitlichen Verlauf der Rap-Aktivierung bei der Ausbildung Integrin-basierter Zell-Matrix-Kontakte und während der Zell-Migration ist noch nichts bekannt.

Parallel zu der vorliegenden Arbeit ist auch eine trivalente Ras-GTP – spezifische Reporter-sonde entwickelt worden (Augsten, 2005). Reizvoll wäre deren Anwendung in Kombination mit RGR-K48D-3 zur parallelen Detektion von aktivem Ras und Rap. Als Modelsystem dafür bieten sich PC12-Zellen an, in denen durch NGF Ras und Rap mit unterschiedlichen Kinetiken aktiviert werden (York, 1998).

7. Referenzen

- Amsen, D., Kruisbeek, A., Bos, J.L. and Reedquist, K.** 2000. Activation of the Ras-related GTPase Rap1 by thymocyte TCR engagement and during selection. *Eur J Immunol*, **30**: 2832-41.
- Amyere, M., Payraastre, B., Krause, U., Van Der Smissen, P., Veithen, A. and Courtoy, P.J.** 2000. Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Mol Biol Cell*, **11**: 3453-67.
- Aoki, K., Nakamura, T. and Matsuda, M.** 2004. Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem*, **279**: 713-9.
- Arai, A., Nosaka, Y., Kanda, E., Yamamoto, K., Miyasaka, N. and Miura, O.** 2001. Rap1 is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in regulation of beta1 integrin-mediated hematopoietic cell adhesion. *J Biol Chem*, **276**: 10453-62.
- Arthur, W.T., Quilliam, L.A. and Cooper, J.A.** 2004. Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. *J Cell Biol*, **167**: 111-22.
- Augsten, M., Pusch, R., Rennert, K., Wittig, U., Beyer, K., Blume, A., Wetzker, R., Friedrich, K. and Rubio, I.** 2005. Live-cell monitoring of cell-endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane. *Nat Cell Biol*, **under revision**.
- Balduini, A., Pecci, A., Lova, P., Arezzi, N., Marseglia, C., Bellora, F., Perotti, C., Balduini, C., Balduini, C.L. and Torti, M.** 2004. Expression, activation, and subcellular localization of the Rap1 GTPase in cord blood-derived human megakaryocytes. *Exp Cell Res*, **300**: 84-93.
- Barker, S.A., Caldwell, K.K., Pfeiffer, J.R. and Wilson, B.S.** 1998. Wortmannin-sensitive phosphorylation, translocation, and activation of PLCgamma1, but not PLCgamma2, in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Mol Biol Cell*, **9**: 483-96.
- Beranger, F., Goud, B., Tavitian, A. and de Gunzburg, J.** 1991. Association of the Ras-antagonistic Rap1/Krev-1 proteins with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 1606-10.
- Bertoni, A., Tadokoro, S., Eto, K., Pampori, N., Parise, L.V., White, G.C. and Shattil, S.J.** 2002. Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin alpha IIb beta 3, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **277**: 25715-21.
- Bivona, T.G., Perez De Castro, I., Ahearn, I.M., Grana, T.M., Chiu, V.K., Lockyer, P.J., Cullen, P.J., Pellicer, A., Cox, A.D. and Philips, M.R.** 2003. Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature*, **424**: 694-8.
- Bivona, T.G., Wiener, H.H., Ahearn, I.M., Silletti, J., Chiu, V.K. and Philips, M.R.** 2004. Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. *J Cell Biol*, **164**: 461-70.
- Block, C., Janknecht, R., Herrmann, C., Nassar, N. and Wittinghofer, A.** 1996. Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction in vitro to Raf activation in vivo. *Nat Struct Biol*, **3**: 244-51.
- Bondeva, T., Balla, A., Varnai, P. and Balla, T.** 2002. Structural determinants of Ras-Raf interaction analyzed in live cells. *Mol Biol Cell*, **13**: 2323-33.
- Bos, J.L., de Bruyn, K., Enserink, J., Kuiperij, B., Rangarajan, S., Rehmann, H., Riedl, J., de Rooij, J., van Mansfeld, F. and Zwartkruis, F.** 2003. The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem Soc Trans*, **31**: 83-6.
- Bos, J.L., de Rooij, J. and Reedquist, K.A.** 2001. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**: 369-77.
-

- Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Barber, D.L. and Nadler, L.M.** 1997. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science*, **278**: 124-8.
- Caloca, M.J., Zugaza, J.L., Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F. and Bustelo, X.R.** 2004. F-actin-dependent translocation of the Rap1 GDP/GTP exchange factor RasGRP2. *J Biol Chem*, **279**: 20435-46.
- Carey, K.D., Dillon, T.J., Schmitt, J.M., Baird, A.M., Holdorf, A.D., Straus, D.B., Shaw, A.S. and Stork, P.J.** 2000. CD28 and the tyrosine kinase Ick stimulate mitogen-activated protein kinase activity in T cells via inhibition of the small G protein Rap1. *Mol Cell Biol*, **20**: 8409-19.
- Caron, E.** 2003. Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. *J Cell Sci*, **116**: 435-40.
- Caron, E., Self, A.J. and Hall, A.** 2000. The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin α M β 2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol*, **10**: 974-8.
- Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R.L., 2nd, Cox, A.D. and Philips, M.R.** 2002. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol*, **4**: 343-50.
- Christian, S.L., Lee, R.L., McLeod, S.J., Burgess, A.E., Li, A.H., Dang-Lawson, M., Lin, K.B. and Gold, M.R.** 2003. Activation of the Rap GTPases in B lymphocytes modulates B cell antigen receptor-induced activation of Akt but has no effect on MAPK activation. *J Biol Chem*, **278**: 41756-67.
- Cook, S.J., Rubinfeld, B., Albert, I. and McCormick, F.** 1993. RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *Embo J*, **12**: 3475-85.
- de Bruyn, K.M., Rangarajan, S., Reedquist, K.A., Figdor, C.G. and Bos, J.L.** 2002. The small GTPase Rap1 is required for Mn(2+)- and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*, **277**: 29468-76.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. and Bos, J.L.** 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**: 474-7.
- Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Døskeland, S.O., Blank, J.L. and Bos, J.L.** 2002. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol*, **4**: 901-6.
- Enserink, J.M., Price, L.S., Methi, T., Mahic, M., Sonnenberg, A., Bos, J.L. and Tasken, K.** 2004. The cAMP-Epac-Rap1 pathway regulates cell spreading and cell adhesion to laminin-5 through the α 3 β 1 integrin but not the α 6 β 4 integrin. *J Biol Chem*, **279**: 44889-96.
- Fukuyama, T., Ogita, H., Kawakatsu, T., Fukuhara, T., Yamada, T., Sato, T., Shimizu, K., Nakamura, T., Matsuda, M. and Takai, Y.** 2004. Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions. *J Biol Chem*.
- Gao, X., Satoh, T., Liao, Y., Song, C., Hu, C.D., Kariya Ki, K. and Kataoka, T.** 2001. Identification and characterization of RA-GEF-2, a Rap guanine nucleotide exchange factor that serves as a downstream target of M-Ras. *J Biol Chem*, **276**: 42219-25.
- Geyer, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Wittinghofer, A. and Kalbitzer, H.R.** 1997. Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signalling. *Nat Struct Biol*, **4**: 694-9.
- Hayakawa, A., Hayes, S.J., Lawe, D.C., Sudharshan, E., Tuft, R., Fogarty, K., Lambright, D. and Corvera, S.** 2004. Structural basis for endosomal targeting by FYVE domains. *J Biol Chem*, **279**: 5958-66.
-

- Herrmann, C.** 2003. Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol*, **13**: 122-9.
- Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C.R., Bialucha, C.U., Feller, S.M., Braga, V.M., Birchmeier, W. and Fujita, Y.** 2004. Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol*, **24**: 6690-700.
- Hogg, N., Laschinger, M., Giles, K. and McDowall, A.** 2003. T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci*, **116**: 4695-705.
- Itoh, R.E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N. and Matsuda, M.** 2002. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol*, **22**: 6582-91.
- Jiang, X. and Sorkin, A.** 2002. Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cells. *Mol Biol Cell*, **13**: 1522-35.
- Jordan, J.D., Carey, K.D., Stork, P.J. and Iyengar, R.** 1999. Modulation of rap activity by direct interaction of G α (o) with Rap1 GTPase-activating protein. *J Biol Chem*, **274**: 21507-10.
- Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N., Irie, S., Takatsu, K. and Kinashi, T.** 2000. Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol Cell Biol*, **20**: 1956-69.
- Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N. and Kinashi, T.** 2002. Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T-cell responses. *Mol Cell Biol*, **22**: 1001-15.
- Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M. and Kinashi, T.** 2003. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol*, **4**: 741-8.
- Katagiri, K., Ohnishi, N., Kabashima, K., Iyoda, T., Takeda, N., Shinkai, Y., Inaba, K. and Kinashi, T.** 2004a. Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nat Immunol*, **5**: 1045-51.
- Katagiri, K., Shimonaka, M. and Kinashi, T.** 2004b. Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C- γ 1. *J Biol Chem*, **279**: 11875-81.
- Kim, S.H., Li, Z. and Sacks, D.B.** 2000. E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J Biol Chem*, **275**: 36999-7005.
- Kirchner, J., Kam, Z., Tzur, G., Bershadsky, A.D. and Geiger, B.** 2003. Live-cell monitoring of tyrosine phosphorylation in focal adhesions following microtubule disruption. *J Cell Sci*, **116**: 975-86.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. and Noda, M.** 1989. A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell*, **56**: 77-84.
- Kraynov, V.S., Chamberlain, C., Bokoch, G.M., Schwartz, M.A., Slabaugh, S. and Hahn, K.M.** 2000. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*, **290**: 333-7.
- Krugmann, S., Williams, R., Stephens, L. and Hawkins, P.T.** 2004. ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Curr Biol*, **14**: 1380-4.
- Lafuente, E.M., van Puijenbroek, A.A., Krause, M., Carman, C.V., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Constantine, E., Springer, T.A., Gertler, F.B. and Boussiotis, V.A.** 2004. RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Dev Cell*, **7**: 585-95.
- Lerosey, I., Pizon, V., Tavitian, A. and de Gunzburg, J.** 1991. The cAMP-dependent protein kinase phosphorylates the rap1 protein in vitro as well as in intact fibroblasts, but not the closely related rap2 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **175**: 430-6.
- Liao, Y., Satoh, T., Gao, X., Jin, T.G., Hu, C.D. and Kataoka, T.** 2001. RA-GEF-1, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1, is activated by translocation induced by
-

association with Rap1*GTP and enhances Rap1-dependent B-Raf activation. *J Biol Chem*, **276**: 28478-83.

Lottspeich, F. and Zorbas, H. 1998. Bicinchoninsäure-Assay. In: *Bioanalytik*, pp. 40.

Maridonneau-Parini, I. and de Gunzburg, J. 1992. Association of rap1 and rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils. Translocation to the plasma membrane during cell activation. *J Biol Chem*, **267**: 6396-402.

McLeod, S.J., Ingham, R.J., Bos, J.L., Kurosaki, T. and Gold, M.R. 1998. Activation of the Rap1 GTPase by the B cell antigen receptor. *J Biol Chem*, **273**: 29218-23.

McLeod, S.J., Li, A.H., Lee, R.L., Burgess, A.E. and Gold, M.R. 2002. The Rap GTPases regulate B cell migration toward the chemokine stromal cell-derived factor-1 (CXCL12): potential role for Rap2 in promoting B cell migration. *J Immunol*, **169**: 1365-71.

McLeod, S.J., Shum, A.J., Lee, R.L., Takei, F. and Gold, M.R. 2003. The Rap GTPases regulate integrin-mediated adhesion, cell spreading, actin polymerization, and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes. *J Biol Chem*.

Meng, J., Glick, J.L., Polakis, P. and Casey, P.J. 1999. Functional interaction between Galpha(z) and Rap1GAP suggests a novel form of cellular cross-talk. *J Biol Chem*, **274**: 36663-9.

Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T., Ozaki, T., Kitabatake, A., Nagashima, K. and Matsuda, M. 1999. Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature*, **400**: 891-4.

Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A. and Matsuda, M. 2001. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature*, **411**: 1065-8.

Nagata, K. and Nozawa, Y. 1995. A low M(r) GTP-binding protein, Rap1, in human platelets: localization, translocation and phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Br J Haematol*, **90**: 180-6.

Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Touthkine, A. and Hahn, K.M. 2004. Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science*, **305**: 1615-9.

Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Block, C., Janknecht, R. and Wittinghofer, A. 1996. Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nat Struct Biol*, **3**: 723-9.

Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F. and Wittinghofer, A. 1995. The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, **375**: 554-60.

Noda, Y., Horikawa, S., Furukawa, T., Hirai, K., Katayama, Y., Asai, T., Kuwahara, M., Katagiri, K., Kinashi, T., Hattori, M., Minato, N. and Sasaki, S. 2004. Aquaporin-2 trafficking is regulated by PDZ-domain containing protein SPA-1. *FEBS Lett*, **568**: 139-45.

Nomura, K., Kanemura, H., Satoh, T. and Kataoka, T. 2004. Identification of a novel domain of Ras and Rap1 that directs their differential subcellular localizations. *J Biol Chem*, **279**: 22664-73.

Ohba, Y., Ikuta, K., Ogura, A., Matsuda, J., Mochizuki, N., Nagashima, K., Kurokawa, K., Mayer, B.J., Maki, K., Miyazaki, J. and Matsuda, M. 2001. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *Embo J*, **20**: 3333-41.

Ohba, Y., Kurokawa, K. and Matsuda, M. 2003. Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *Embo J*, **22**: 859-69.

Okada, S., Matsuda, M., Anafi, M., Pawson, T. and Pessin, J.E. 1998. Insulin regulates the dynamic balance between Ras and Rap1 signaling by coordinating the assembly states of the Grb2-SOS and CrkII-C3G complexes. *Embo J*, **17**: 2554-65.

Okada, T., Hu, C.D., Jin, T.G., Kariya, K., Yamawaki-Kataoka, Y. and Kataoka, T. 1999. The strength of interaction at the Raf cysteine-rich domain is a critical determinant of response of Raf to Ras family small GTPases. *Mol Cell Biol*, **19**: 6057-64.

- Pizon, V., Chardin, P., Lerosey, I., Olofsson, B. and Tavitian, A.** 1988. Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. *Oncogene*, **3**: 201-4.
- Pizon, V., Desjardins, M., Bucci, C., Parton, R.G. and Zerial, M.** 1994. Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J Cell Sci*, **107** (Pt 6): 1661-70.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J.** 1992. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, **111**: 229-33.
- Price, L.S., Hajdo-Milasinovic, A., Zhao, J., Zwartkruis, F.J., Collard, J.G. and Bos, J.L.** 2004. Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, **279**: 35127-32.
- Quinn, M.T., Mullen, M.L., Jesaitis, A.J. and Linner, J.G.** 1992. Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood*, **79**: 1563-73.
- Rangarajan, S., Enserink, J.M., Kuiperij, H.B., de Rooij, J., Price, L.S., Schwede, F. and Bos, J.L.** 2003. Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol*, **160**: 487-93.
- Rebstein, P.J., Cardelli, J., Weeks, G. and Spiegelman, G.B.** 1997. Mutational analysis of the role of Rap1 in regulating cytoskeletal function in Dictyostelium. *Exp Cell Res*, **231**: 276-83.
- Reedquist, K.A. and Bos, J.L.** 1998. Costimulation through CD28 suppresses T cell receptor-dependent activation of the Ras-like small GTPase Rap1 in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, **273**: 4944-9.
- Reedquist, K.A., Ross, E., Koop, E.A., Wolthuis, R.M., Zwartkruis, F.J., van Kooyk, Y., Salmon, M., Buckley, C.D. and Bos, J.L.** 2000. The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *J Cell Biol*, **148**: 1151-8.
- Ronnstrand, L., Mori, S., Arridsson, A.K., Eriksson, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Claesson-Welsh, L. and Heldin, C.H.** 1992. Identification of two C-terminal autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor: involvement in the interaction with phospholipase C-gamma. *Embo J*, **11**: 3911-9.
- Sawada, Y., Nakamura, K., Doi, K., Takeda, K., Tobiume, K., Saitoh, M., Morita, K., Komuro, I., De Vos, K., Sheetz, M. and Ichijo, H.** 2001. Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase. *J Cell Sci*, **114**: 1221-7.
- Sawano, A., Takayama, S., Matsuda, M. and Miyawaki, A.** 2002. Lateral propagation of EGF signaling after local stimulation is dependent on receptor density. *Dev Cell*, **3**: 245-57.
- Schlunck, G., Damke, H., Kiosses, W.B., Rusk, N., Symons, M.H., Waterman-Storer, C.M., Schmid, S.L. and Schwartz, M.A.** 2004. Modulation of Rac localization and function by dynamin. *Mol Biol Cell*, **15**: 256-67.
- Schmitt, J.M. and Stork, P.J.** 2002. PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol Cell*, **9**: 85-94.
- Sebzda, E., Bracke, M., Tugal, T., Hogg, N. and Cantrell, D.A.** 2002. Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. *Nat Immunol*, **3**: 251-8.
- Song, C., Hu, C.D., Masago, M., Kariyai, K., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohe, M., Wu, D., Satoh, T. and Kataoka, T.** 2001. Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras. *J Biol Chem*, **276**: 2752-7.
- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D. and Bourne, H.R.** 2003. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol*, **160**: 375-85.
- Stoletov, K.V. and Terman, B.I.** 2004. Bmx is a downstream Rap1 effector in VEGF-induced endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **320**: 70-5.
-

- Su, L., Hattori, M., Moriyama, M., Murata, N., Harazaki, M., Kaibuchi, K. and Minato, N.** 2003. AF-6 controls integrin-mediated cell adhesion by regulating Rap1 activation through the specific recruitment of Rap1GTP and SPA-1. *J Biol Chem*, **278**: 15232-8.
- Suga, K., Katagiri, K., Kinashi, T., Harazaki, M., Iizuka, T., Hattori, M. and Minato, N.** 2001. CD98 induces LFA-1-mediated cell adhesion in lymphoid cells via activation of Rap1. *FEBS Lett*, **489**: 249-53.
- Swanson, J.A.** 1989. Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J Cell Sci*, **94** (Pt 1): 135-42.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T.** 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **81**: 153-208.
- Takaya, A., Ohba, Y., Kurokawa, K. and Matsuda, M.** 2004. RalA activation at nascent lamellipodia of epidermal growth factor-stimulated Cos7 cells and migrating Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, **15**: 2549-57.
- Traver, S., Bidot, C., Spassky, N., Baltauss, T., De Tand, M.F., Thomas, J.L., Zalc, B., Janoueix-Lerosey, I. and Gunzburg, J.D.** 2000. RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of galphao. *Biochem J*, **350** Pt 1: 19-29.
- Tsukamoto, N., Hattori, M., Yang, H., Bos, J.L. and Minato, N.** 1999. Rap1 GTPase-activating protein SPA-1 negatively regulates cell adhesion. *J Biol Chem*, **274**: 18463-9.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R. et al.** 2001. The sequence of the human genome. *Science*, **291**: 1304-51.
- Verveer, P.J., Wouters, F.S., Reynolds, A.R. and Bastiaens, P.I.** 2000. Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane. *Science*, **290**: 1567-70.
- York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W. and Stork, P.J.** 1998. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, **392**: 622-6.
- Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R.E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima, K. and Matsuda, M.** 2003. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol*, **162**: 223-32.
- Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y. and Tsien, R.Y.** 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**: 906-18.
- Zhu, J.J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L. and Malinow, R.** 2002. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*, **110**: 443-55.
- Zwartkruis, F.J., Wolthuis, R.M., Nabben, N.M., Franke, B. and Bos, J.L.** 1998. Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. *Embo J*, **17**: 5905-12.
-

Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>Amino acid</i>
Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxazol-Propionat
BCR	<i>B cell receptor</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
CRD	<i>Cysteine rich domain</i>
CRIB	<i>Cdc42/Rac1 interactive binding motif</i>
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxide
DOPE	<i>dioleoyl phosphatidylethanolamine</i>
DOSPA	<i>2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate</i>
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>Enhanced GFP</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> (auch Förster RET)
FYVE	Fab1, YotB, Vac1, EEA1 (vier Proteine mit FYVE-Domäne)
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>Guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule -1</i>
I κ B	<i>Inhibitor of NFκB</i>
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ITC	Isothermale Kalorimetrie
LFA-1	<i>Leukocyte function antigene 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid

LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
MAP-Kinase	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NF κ B	<i>Nuclear factor, κ-chain in B cells</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDGFR	<i>PDGF receptor</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule -1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PTB	<i>Phosphotyrosine binding</i>
Tab.	Tabelle
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TPA	12,13-Tetradecanoylphorbolacetat
Raichu	<i>Ras and interacting protein chimeric unit</i>
RalGDS	<i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i> (GEF für Ral)
RAPL	<i>Regulator of adhesion and polarization enriched in lymphocytes</i>
RBD	<i>Ras/Rap-binding domain</i> von Raf-1
RGR	RalGDS-RBD (Ras/Rap-Bindedomäne aus RalGDS)
RGR-K48D-3	Trimere RGR mit K48D Substitution, EGFP-markiert
RGR-WT-1	Monomere RGR, EGFP-markiert
RGR-WT-2	Dimere RGR, EGFP-markiert
RGR-WT-3	Trimere RGR, EGFP-markiert
SDF-1	<i>Stromal cell derived factor -1</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule -1</i>
VLA-4	<i>Very late antigen -4</i>
WT	Wildtyp
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, ...

... daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe,

... daß mir die Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist,

... daß ich weder die vorliegende Dissertation noch Teile der Arbeit für eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Jena, den 17. 12. 2004

Rico Pusch

Danksagungen

Mein Dank gilt all denen, die durch ihre Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Ignacio Rubio für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und bei Martin Augsten für die gute Zusammenarbeit.

Bei Prof. Dr. Stefan Heinemann, Dr. Peter Hemmerich, Dr. Solveig Hehl, Dr. Jörg Lindenau und Dr. A. Berndt bedanke ich mich dafür, dass sie mir die Nutzung ihrer Laser-Scanning-Mikroskope ermöglichten.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe "Molekulare Zellbiologie", die keine Gelegenheit ungenutzt gelassen haben, mich in meiner Arbeit zu unterstützen. Mindestens genauso wichtig, war mir das sehr angenehme Arbeitsklima, was ich in der Arbeitsgruppe vorgefunden habe.

Ich danke auch Prof. Dr. Reinhard Wetzker, Prof. Claus Liebmann und Prof. Christian Herrmann, die sich bereit erklärt haben, diese Arbeit zu begutachten.

Lebenslauf

Person

Name Pusch
Vorname Rico
Geburtsdatum 06.03.1977
Geburtsort Wolfen (Sachsen-Anhalt)

Schule

1983-1985 POS Otto Winkler, Wolfen
1985-1989 POS Wilhelm Pieck, Wolfen
1989-1991 POS Theodor Neubauer, Raguhn
1991-1995 mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium Georg-Cantor, Halle a.S.
Abitur mit “gut” (1,7)

Akademische Laufbahn

1996- 2001 Studium der Biochemie / Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-
Universität Jena,
Diplom mit “sehr gut” (1,0)

2001 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie, FSU Jena
unter Betreuung von PD Dr. Frank-D. Böhmer
*“Mechanismus der Interaktion zwischen der Proteintyrosinphosphatase
SHP-1 und der Rezeptortyrosinkinase Ros“*

2001-2004 Promotion in der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie, FSU Jena
unter Betreuung von Dr. Ignacio Rubio und Prof. Dr. Reinhard Wetzker
*“Entwicklung einer multivalenten Reportersonde zur Visualisierung
endogener Aktivität der kleinen GTPase Rap in lebenden Zellen“*

Publikationen

Rubio I, **Pusch R**, Wetzker R

Quantification of absolute Ras-GDP/GTP levels by HPLC separation of Ras-bound [^{32}P]-labelled nucleotides

Journal of Biochemical and Biophysical Methods; 2004 Feb 27; 58 (2); 111-7

Biskup C¹, Bohmer SA¹, **Pusch R**¹, Kelbauskas L, Gorshokov A, Majoul I, Lindenau J, Benndorf K, Bohmer FD

Visualization of SHP-1 target interaction

Journal of Cell Science, 2004, 117, 5165-5178,

¹These authors contributed equally to this work.

Augsten M¹, **Pusch R**¹, Rennert K, Wittig U, Beyer K, Blume A, Wetzker R, Friedrich KH, Rubio I

Live-cell monitoring of endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane

Nature Cell Biology, under revision

¹These authors contributed equally to this work.

Wissenschaftliche Vorträge

Regulation of the epididymal receptor tyrosine kinase Ros by the protein tyrosine phosphatase SHP-1

8th Congress of the Alps Adria Society for Immunology of Reproduction
September 7-10, 2002
